



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C07H 19/06, 19/16, 21/00 // C12N 15/00	A1	(11) 国際公開番号 WO98/39352
		(43) 国際公開日 1998年9月11日(11.09.98)
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/00945	(81) 指定国 AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) 国際出願日 1998年3月9日(09.03.98)		
(30) 優先権データ 特願平9/53409 1997年3月7日(07.03.97) JP		
(71) 出願人 ; および (72) 発明者 今西 武(IMANISHI, Takeshi)[JP/JP] 〒631-0045 奈良県奈良市千代ヶ丘2丁目2-18 Nara, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 小比賀聡(OBIKA, Satoshi)[JP/JP] 〒569-1022 大阪府高槻市日吉台四番町2034 Osaka, (JP) (74) 代理人 弁理士 社本一夫, 外(SHAMOTO, Ichio et al.) 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 湯浅法律特許事務所 Tokyo, (JP)	添付公開書類 国際調査報告書	
(54)Title: NOVEL BICYCLONUCLEOSIDE AND OLIGONUCLEOTIDE ANALOGUES		
(54)発明の名称 新規ビシクロヌクレオシド及びオリゴヌクレオチド類縁体		
(57) Abstract Oligo- or polynucleotide analogues each having one or two structures represented by general formula (I) wherein B represents pyrimidine or purine nucleic acid base or analogue thereof. They can provide antisense molecules of oligonucleotide analogues that are less likely to undergo enzymatic hydrolysis <i>in vivo</i> , have a high capability of binding to sense chains, and can be easily synthesized.		
<p>(I)</p>		

明 細 書

新規ビスクロヌクレオシド及びオリゴヌクレオチド類縁体

〔技術分野〕

本発明は新規なヌクレオシド類縁体とヌクレオチド類縁体に関し、更に詳細に
5 はアンチセンス分子に適したヌクレオチド類縁体に関するものである。

〔背景技術〕

1978年にアンチセンス分子がインフルエンザウィルスの感染を阻害したとの報告が初めて成された。以後、ガン遺伝子発現やAIDS感染を阻害したとの報告もなされている。アンチセンスオリゴヌクレオチドが望ましくない遺伝子の
10 発現を特異的に制御することから、医薬品として近年、最も期待されている分野の一つである。

アンチセンス法とは、DNA→RNA→タンパク質という、いわゆるセントラルドグマの一連の流れをアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて制御しようという概念に基づいている。

15 しかしながら、天然型オリゴヌクレオチドをアンチセンス分子としてこの方法に適用した場合、生体内の各種ヌクレアーゼにより分解を受けたり、細胞膜透過性が高くないなどの問題が生じた。そのため、様々な核酸誘導体や類縁体が数多く合成され、研究が重ねられてきた。例えば、リン原子上の酸素原子をイオウ原子に置換したホスホロチオエート、メチル基に置換したメチルホスホネート、また
20 最近になっては、リン原子も炭素原子で置換したもの、さらには糖部の構造を変換したもの、核酸塩基を修飾したものなども合成されている。しかし、いずれの場合も、生体内での安定性、合成の容易さ、配列特異性（特定の遺伝子発現のみを選択的に制御する）などの点で十分に満足のいく誘導体や類縁体が得られていないのが現状である。

25 生体内でヌクレアーゼによる分解を受けにくく、高い親和力で標的のメッセンジャーRNAに結合し、その特異性に優れ、よって特定の遺伝子の発現を効率よく制御することのできるアンチセンス用の分子の創製が望まれている。

〔発明の開示〕

本発明の発明者らは、アンチセンス法において有用と考えられる、核酸における糖部のコンホメーションの固定化を施した核酸類縁体を設計し、その単位構造となるヌクレオシド類縁体の合成を行い、これを用いて調製したオリゴヌクレオチド類縁体にアンチセンス分子として極めて有用であることを確認した。

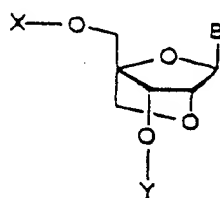
5 〔図面の簡単な説明〕

第1図は、天然型のオリゴヌクレオチドをエキソヌクレアーゼで分解した時の紫外吸収（260nm）の経時変化を示すチャートである。

第2図は、本発明のオリゴヌクレオチド（X2）をエキソヌクレアーゼで分解した時の紫外吸収（260nm）の経時的変化を示すチャートである。

10 以下に本発明の詳細を説明する。

本発明のヌクレオシド類縁体の構造は下記の一般式（I）で表すことができる。



(I)

15 〔式中、Bはピリミジンもしくはプリン核酸塩基又はそれらの類縁体であり、X及びYは同一もしくは異なり、水素、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、アラルキル基、アリール基、アシル基、又はシリル基である〕で表わされるヌクレオシド類縁体もしくはそれらのアミダイト誘導体である。

20 アルキル基とは炭素数1-20の直鎖または分枝鎖状のアルキル基を示し、例えば、メチル基、エチル基、n-プロピル基、i-プロピル基、n-ブチル基、t-ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基等があげられる。

アルケニル基とは、炭素数 2 - 20 の直鎖または分枝鎖状のアルケニル基を示し、例えば、ビニル基、アリル基、ブテニル基、ペンテニル基、ゲラニル基、フェルネシル基等があげられる。

5 アルキニル基とは、炭素数 2 - 20 の直鎖または分枝鎖状のアルキニル基を示し、例えば、エチニル基、プロピニル基、ブチニル基等があげられる。

シクロアルキル基とは、炭素数 3 - 8 のシクロアルキル基を示し、例えば、シクロプロピル基、シクロブチル基、シクロペンチル基、シクロヘキシル基、シクロヘプチル基、シクロオクチル基等があげられる。シクロアルキル基の環上の 1 つ以上の任意のメチレンが酸素原子や硫黄原子あるいはアルキル基で置換された窒素原子に置換された複素環基も含まれ、例えばテトラヒドロピラニル基などが
10 あげられる。

アリール基とは、芳香族複素環基又は芳香族炭化水素基、から水素原子 1 個を除いた 1 価の置換基を意味し、好ましくは、芳香族炭化水素基から水素原子 1 個を除いた 1 価の置換基を意味し、例えば、フェニル基、トリル基、キシリル基、
15 ビフェニル基、ナフチル基、アントリル基、フェナントリル基等である。また、アリール基の環上の炭素原子はハロゲン原子、低級アルキル基、水酸基、アルコキシ基、アミノ基、ニトロ基、トリフルオロメチル基等の 1 種以上の基によって置換されていてもよい。置換基としてはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、アルコキシ基、アリールオキシ基等があげられる。

20 アラルキル基とは、アリール基にアルキル基が結合した基で、アラルキル基は置換されていてもよい。置換されていてもよいアラルキル基とはアリール基にアルキル基が結合した基で、アリール基及びアルキル基の任意の 1 つ以上の水素原子が以下の置換基で置換されていてもよい基を意味する。ここで置換基としては、アシル基、アミノ基、アリール基、アルキル基、シクロアルキル基、アルコ
25 キシ基、水酸基、ニトロ基、ハロゲン原子等がある。

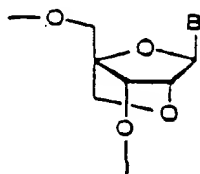
アミノ基は置換されていてもいなくてもよいが、置換されているアミノ基の例としてはアルキルアミノ基、アリールアミノ基、アシルアミノ基等がある。アルコキシ基の例としては、メトキシ基、エトキシ基、n-プロポキシ基、i-プロ

ボキシ基、n-ブトキシ基、i-ブトキシ基、s-ブトキシ基、t-ブトキシ基、ベンチルオキシ基、ヘキシルオキシ基、フェノキシ基等がある。ハロゲン原子としてはフッ素、塩素、臭素、ヨウ素がある。

5 アラルキル基の好ましい例としては、例えばトリチル基、ベンジル基、フェネチル基、トリチルメチル基、ジフェニルメチル基、ナフチルメチル基、4,4'-ジメトキシトリチル(DMT r)基等があるが、特に好ましいのはDMT r基である。

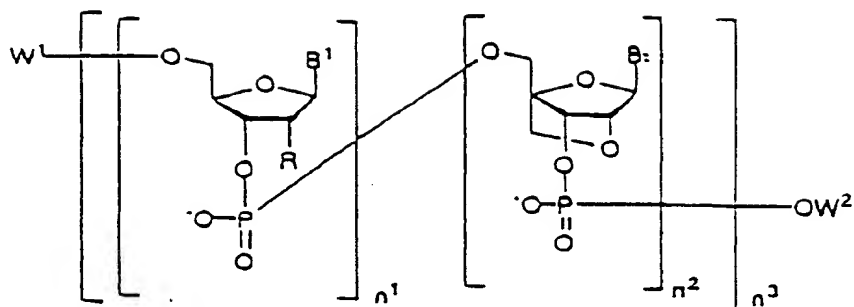
10 アシル基としては、アセチル基、ホルミル基、プロピオニル基、ベンゾイル基、ベンジルオキシカルボニル基等があげられる。シリル基の例としては、トリアルキルシリル基があげられるが、好ましくは、トリメチルシリル基、トリエチルシリル基、トリイソプロピルシリル基、t-ブチルジメチルシリル基、t-ブチルジフェニルシリル基等があげられ、更に好ましくはトリメチルシリル基である。

また、本発明のヌクレオチド類縁体は、一般式(I a)



(I a)

15 [式中、Bはピリミジンもしくはプリン核酸塩基又はそれらの類縁体である]で表される構造を1または2以上有するオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド類縁体、または、一般式(II)



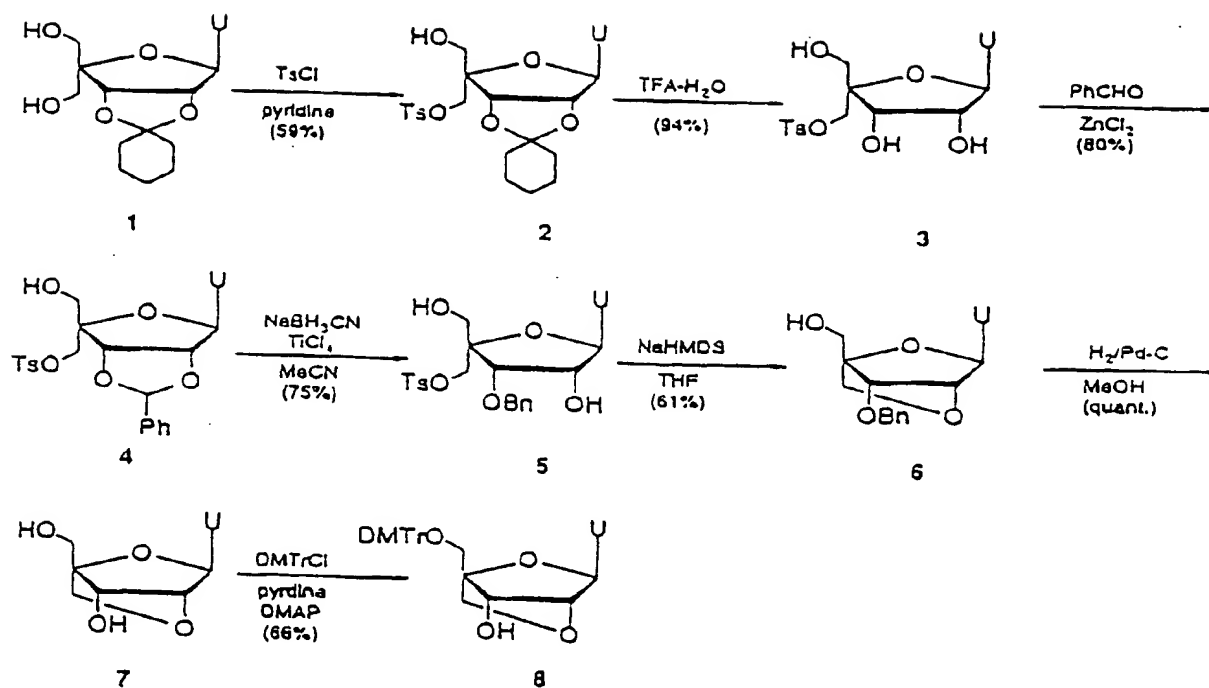
(II)

〔式中、 B^1 、 B は同一または異なり、ピリミジンもしくはプリン核酸塩基又はそれらの類縁体であり、 R は水素、水酸基、ハロゲン、またはアルコキシ基であり、 W^1 、 W^2 は同一または異なり、水素、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、アラルキル基、アリール基、アシル基、シリル基またはリン酸残基もしくはリン酸ジエステル結合を介した天然型ヌクレオシド、合成ヌクレオシドまたはこれらヌクレオシドを含むオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドであり、 n^1 または n^2 は同一または異なり、0～50の整数である（ただし、 n^1 または n^2 が同時にゼロになることはない。また、 n^2 の全てが同時にゼロになることはない。）、 n^3 は1～50の整数である、ただし、 n^1 および/または n^2 が2以上の場合には B^1 と B は同一でなくてもよく、 R も同一でなくてもよい〕で表されるオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチド類縁体である。

本発明における、ピリミジンもしくはプリン核酸塩基とは、チミン、ウラシル、シトシン、アデニン、グアニン及びそれらの誘導体である。

本発明のヌクレオシド類縁体及びヌクレオチド類縁体は次のように合成できる。

(1) ヌクレオシド類縁体の合成

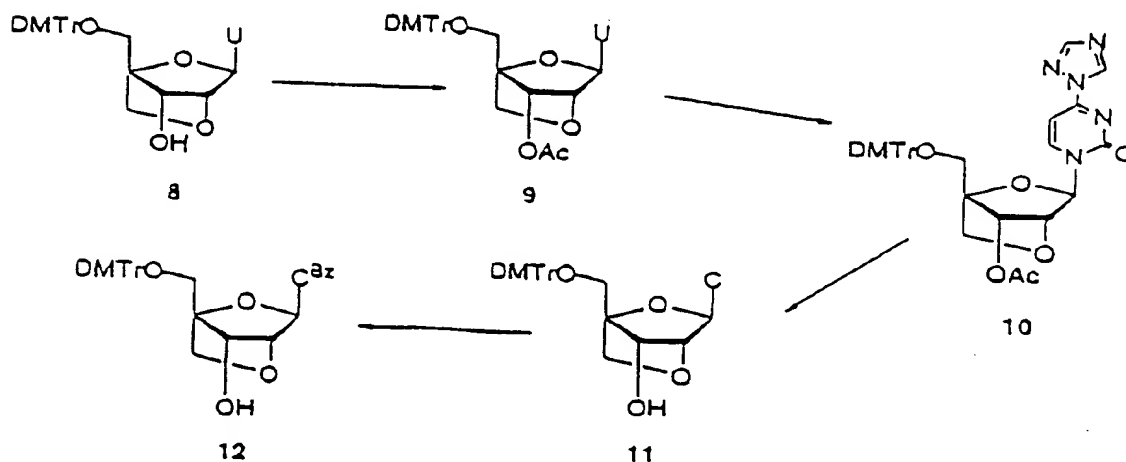


- ウリジンから文献 [1) J. A. Secrist et al., J. Am. Chem. Soc., 101, 1554 (1979); 2) G. H. Jones et al., J. Org. Chem., 44, 1309 (1979)] に従い合成した化合物 1 をトシルクロリド (TsCl) で 2 個ある第一級アルコールの一方のみをトシル化して化合物 2 に導き、酸加水分解してトリオール体 3 とした。
- 5 化合物 3 はベンズアルデヒドと酸触媒下で縮合反応を行いベンジリデン化合物 4 として、このものを四塩化チタン (TiCl_4) 存在下にナトリウムシアノボロヒドリド (NaBH_3CN) で還元すると化合物 5 が得られた。本化合物をテトラヒドロフラン (THF) 中でナトリウムヘキサメチルジシラジド (NaHMD

S) と反応させたところ、ビスクロ化合物 6 (化合物 I : B=ウラシル (U), X=H, Y=ベンジル) が得られた。化合物 6 をパラジウム炭素触媒下で接触還元すると、ジオール化合物 7 (化合物 (I) ; B=U, X=Y=H) が得られ、更に、4、4'-ジメトキシトリチルクロリド (DMTrCl) 処理するとトリチル体 8 (化合物 I : B=U, X=DMTr, Y=H) が得られた。化合物 6、7 及び 8 は様々な化合物 I の原料として利用することができる。

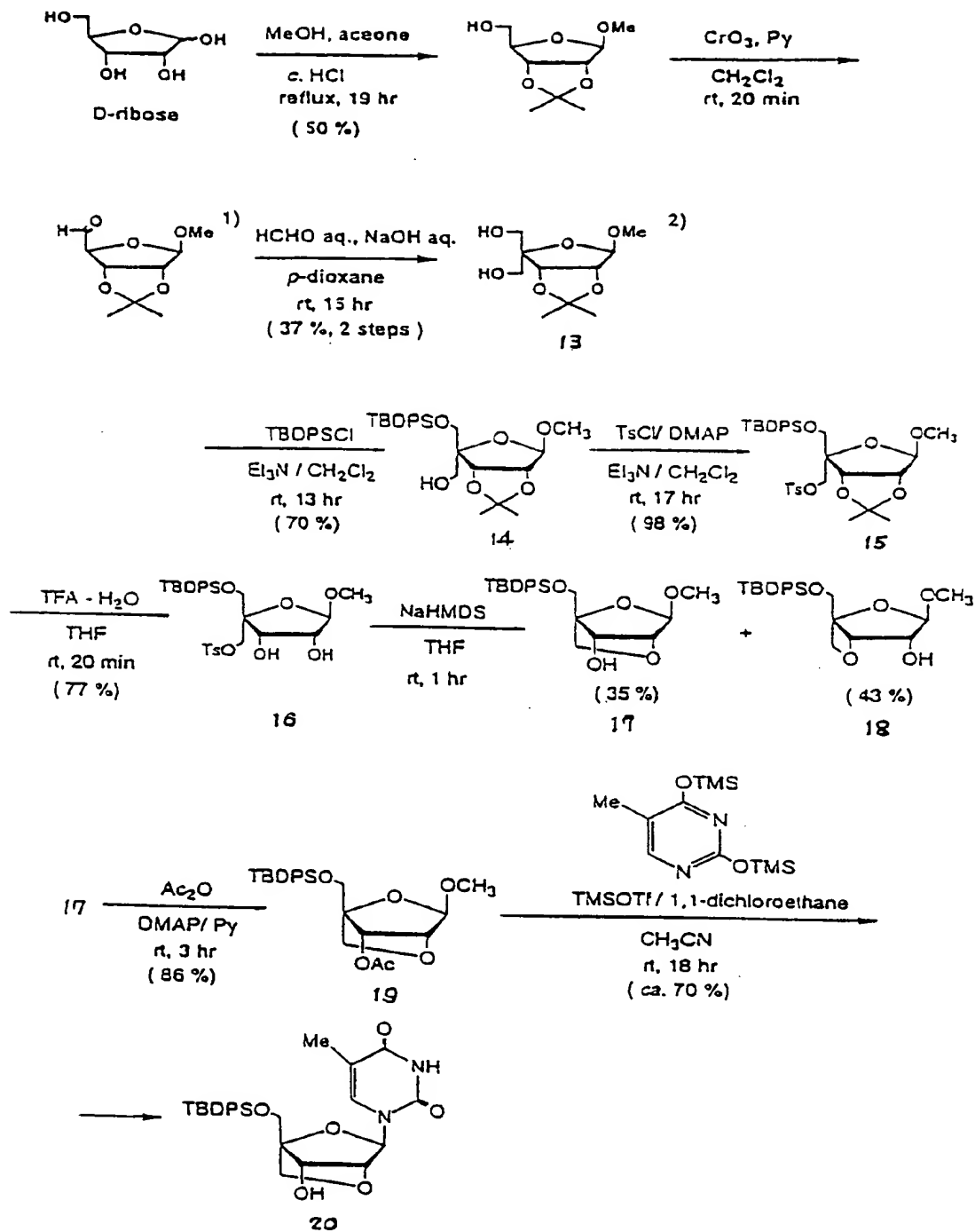
ウリジン以外の天然・非天然を問わず様々な核酸塩基を有する化合物 (I) は 3 通りの方法で合成することができる。

その一つは、化合物 8 からの変換である。すなわち、化合物 8 をアセチル化して化合物 9 とした後、1、2、4-トリアゾールと反応して化合物 10 に導き、加水分解すると化合物 11 (化合物 (I) ; B=シトシン (C), X=DMTr, Y=H) が得られた。オリゴヌクレオチド合成の原料となる化合物 12 (化合物 (I) ; B=ベンゾイルシトシン (C^{Bz}), X=DMTr, Y=H) は化合物 11 のベンゾイル化で容易に得られる。

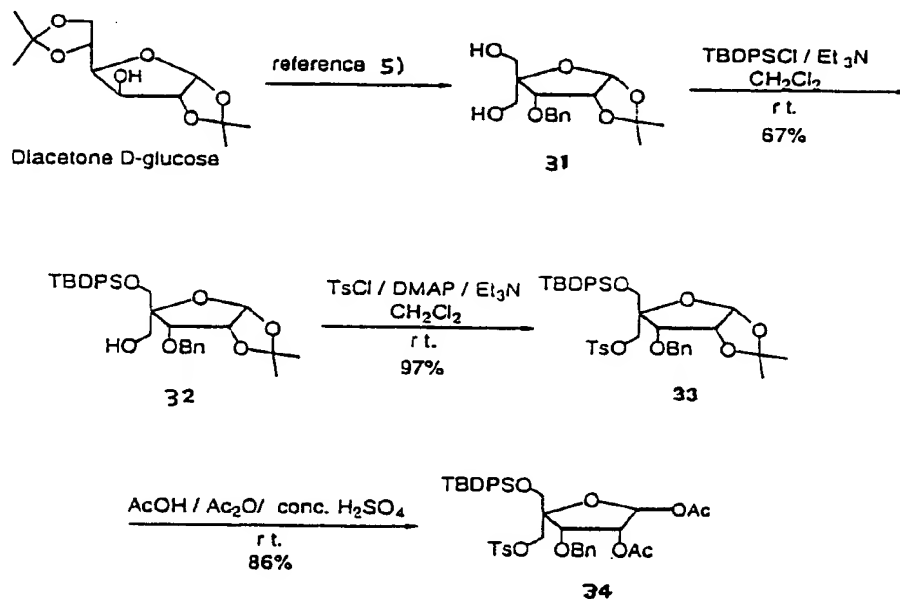


第二の方法はD-リボースから文献 [3) A.G.M. Barrett et al., J. Org. Chem., 55, 3853(1990); 4) G.H. Jones et al., ibid., 44, 1309 (1979)] に従って容易に得られる化合物 13 を経由する方法である。すなわち、化合物 13 を 3 工程で化合物 16 に導き、塩基性条件下に閉環反応すると、目的のメチルグリコ

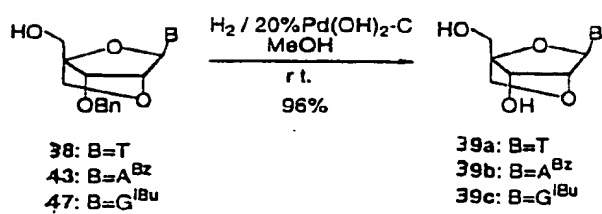
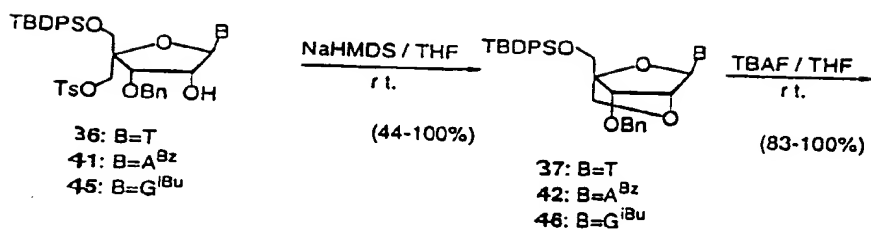
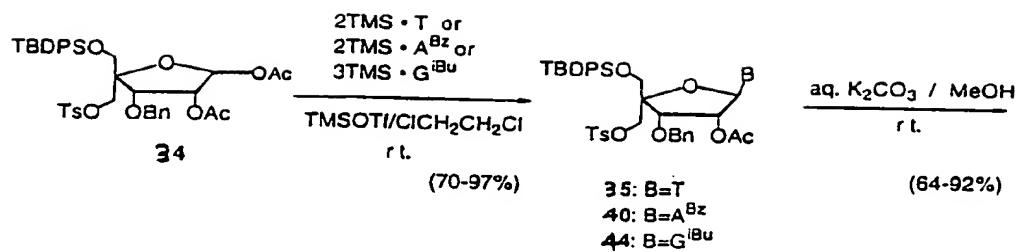
シル化合物 17 が得られた。本化合物の 1 位 OMe 基を天然の様々な核酸塩基や非天然の核酸塩基類縁体に置換するには、既に開発された種々の方法により可能である。例えば、下式化合物 17 から化合物 20 のような方法が使用できる。



さらに、第三の方法としては、D-グルコースから1工程で得られ、しかも市
 販品であるジアセトン D-グルコースを出発原料とする方法である。文献 5) R.
 D. Youssefyeh, J. P. H. Verheyden and J. G. Moffatt., J. Org. Chem., 44,
 1301-1309 (1979) に従って化合物 3 1 を調製する。次いで、化合物 3 1 を下記
 5 の式に示した通り、2 種の 1 級水酸基を t-ブチルジフェニルシリル基、p-トル
 エンスルホニル基で段階的に保護し、アセチル化処理して化合物 3 4 に導いた。

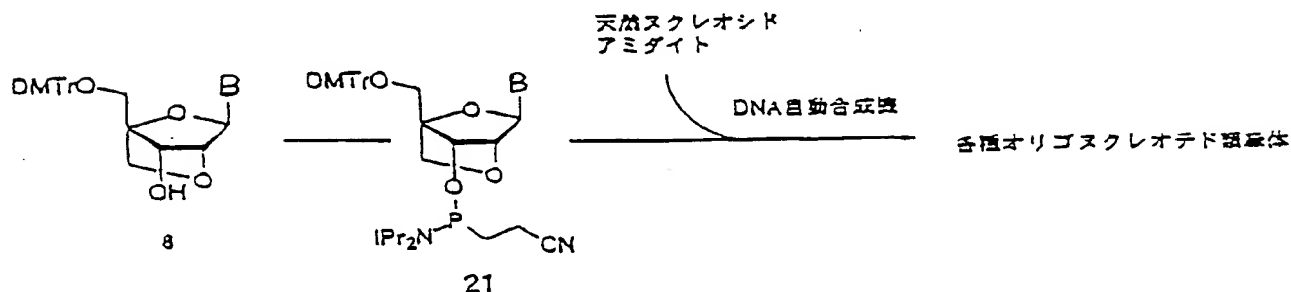


化合物 3 4 にトリメチルシリル化して活性化したチミン (2TMS · T)、ベ
 ンゾイルアデニン (2TMS · A^{Bz})、イソブチリルグアニン (3TMS · G^{iBu})
 を別々に縮合させ、下記の式に示すように、化合物 5、10、14 をそれぞれ高
 10 収率で得た。ついで、これら縮合体は脱アセチル化 (化合物 3 6、4 1、4 5)、
 5 員環形成 (化合物 3 7、4 2、4 6)、脱シリル化 (化合物 3 8、4 3、4 7)
 、更に脱ベンジル化して目的の化合物 3 9 へと誘導した。



(2) オリゴヌクレオチド類縁体の合成

化合物 8 に 2-シアノエチル-N, N, N', N'-テトライソプロピルホスホアミダイトを作用させ、アミダイト体 21 を得、このものと天然ヌクレオシドアミダイト体とを組み合わせ、DNA 自動合成機を用いて種々のオリゴヌクレオチド類縁体を合成する。合成した粗生成物はオリゴバック、逆相クロマトカラムを用いて精製し、精製物の純度を HPLC で分析することにより確認する。



化合物 8 のモノマーユニットは、オリゴヌクレオチド類縁体の中に 1 つ以上存在させることができる。また、オリゴヌクレオチド類縁体の中の 2 ヶ所以上の位置に、1 または 2 以上の天然ヌクレオチドを介して隔離された状態で存在させても良い。本発明に依れば、本発明のヌクレオチド類縁体（ヌクレオシド類縁体）を必要な位置に必要な数（長さ）で導入したアンチセンス分子を合成することができる。オリゴヌクレオチド類縁体全体の長さとしてヌクレオシド単位が 2 ～ 50、好ましくは 10 ～ 30 個である。

このようなオリゴヌクレオチド類縁体（アンチセンス分子）は、各種ヌクレアーゼに対して分解されにくく、生体への投与後、長時間生体内に存在することができる。そして、例えば、メッセンジャー RNA と安定な二重鎖を形成して病因となるタンパク質の生合成を阻害したり、ゲノム中の二重鎖 DNA との間で三重鎖を形成して、メッセンジャー RNA への転写を阻害する。また、感染したウイルスの増殖を抑えることも可能となる。

これらのことから、本発明のヌクレオシド類縁体を用いたオリゴヌクレオチド類縁体（アンチセンス分子）は、抗腫瘍剤、抗ウイルス剤をはじめとした、特定遺伝子の働きを阻害して疾病を治療する医薬品としての有用性が期待される。

本発明のヌクレオチド（ヌクレオチド）類縁体を用いたアンチセンス分子は、例えば、緩衝剤および／または安定剤等の慣用の助剤を配合して非経口投与製剤としたり、リポソーム製剤とすることができる。また、局所用の製剤としては、慣用の医薬用担体を配合して軟膏、クリーム、液剤、または膏薬等に調剤できる。

本発明のヌクレオシド類縁体ならびにヌクレオチド類縁体の合成を実施例および製造例により、さらに詳しく説明する。実施例では、塩基としてウラシルを主として使用しているが、他のプリン核酸塩基も同様に使用できる。

[実施例1] ヌクレオシド類縁体の合成

(1) 2', 3'-O-シクロヘキシリデン-4'-(p-トルエンスルホニルオキシメチル) ウリジン(2)の合成

窒素気流下、文献既知化合物1（956 mg, 2.70 mmol）の無水ピリジン溶液（13.5 ml）に室温でp-トルエンスルホニルクロリド（771 mg, 4.05 mmol）を加え、60 °Cで5時間撹拌した。

反応溶液に飽和重曹水を加えた後、ベンゼンで3回抽出した。有機層を飽和食塩水で1回洗浄後、無水 MgSO₄ にて乾燥した。溶媒を減圧留去し、ベンゼンで3回共沸し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（CHCl₃: MeOH = 15:1）により精製後、ベンゼン-ヘキサンにて再沈澱し、白色粉末として化合物2（808 mg, 1.59 mmol, 59%）を得た。

化合物2：白色粉末 mp 104-106 °C（ベンゼン-ヘキサン）。IR ν (KBr): 3326, 2929, 2850, 1628, 1577, 1544, 1437, 1311, 1244 cm⁻¹. ¹H-NMR (d₆-acetone): δ 1.45-1.67 (10H, m), 2.45 (3H, s), 3.71 (2H, ABq, J = 12 Hz), 4.20 (2H, ABq, J = 11 Hz), 4.92 (1H, d, J' = 6 Hz), 5.05, 5.06 (1H, dd, J = 4, 6 Hz), 5.60 (1H, d, J = 7 Hz), 5.75 (1H, d, J = 4 Hz), 7.48 (2H, d, J = 8 Hz), 7.77 (1H, d, J = 8 Hz), 7.81 (2H, d, J = 8 Hz), 10.10 (1H, s,). ¹³C-NMR (d₆-acetone): δ 21.5, 24.1, 24.5, 25.5, 34.8, 36.9.

63.5, 69.7, 82.5, 84.7, 87.8, 92.9, 102.9, 115.4, 128.8, 130.8, 133.9, 142.7, 145.9, 151.3, 163.5. Mass(EI): m/z 481($M^+ - H_2O$).

Anal. Calcd for $C_{23}H_{28}N_2O_9S \cdot 1/3 H_2O$: C, 53.69; H, 5.61; N, 5.44; S, 6.22. Found: C, 53.99; H, 5.48; N, 5.42; S, 6.10.

5 (2) 4'-(p-トルエンスルホニルオキシメチル)ウリジン(3)の合成

化合物2 (107 mg, 0.21 mmol)をTFA-H₂O (98:2, 1 ml)中室温で10分間攪拌した。反応溶液を減圧留去し、EtOHを加えて3回共沸した。得られた粗成續体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHCl₃:MeOH = 10:1)により精製し、化合物3 (85.0 mg, 0.20 mmol, 94%)を得た。

10 化合物3: 白色粉末 mp 119-120 °C. IR ν (KBr): 3227, 3060, 2932, 2837, 1709, 1508, 1464, 1252, 978, 835, 763, 556 cm⁻¹. ¹H-NMR (d₆-acetone): δ 2.31 (3H, s), 2.84 (3H, s), 3.71 (2H, s), 4.13, 4.20 (2H, ABq, J = 11 Hz), 4.28, 4.31 (1H, dd, J' = 9, 6 Hz), 4.36 (1H, d, J' = 6 Hz), 5.54 (1H, d, J' = 8 Hz), 5.75 (1H, d, J = 7 Hz), 7.32 (2H, d, J = 8 Hz), 7.67
15 (2H, d, J = 8 Hz), 7.70 (1H, d, J' = 8 Hz), 10.14 (1H, s). ¹³C-NMR (d₆-acetone): δ 21.5, 63.7, 70.8, 72.7, 74.6, 86.8, 88.8, 103.1, 128.8, 130.7, 133.9, 141.7, 145.8, 151.8, 163.9. Mass (EI): m/z 256 ($M^+ - OTs$).

(3) 2', 3'-O-ベンジリデン-4'-(p-トルエンスルホニルオキシメチル)ウリジン(4)の合成

20 窒素気流下、化合物3 (400 mg, 0.93 mmol)にベンズアルデヒド (2.4 ml, excess)、塩化亜鉛 (670 mg, 5.0 mmol)を加え室温にて5時間攪拌した。反応を飽和重曹水により止め、クロロホルムで抽出し、飽和重曹水、水、飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒留去後シリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHCl₃:MeOH = 40:1)により精製し、化合物4 (380 mg,
25 0.74 mmol, 80%)を得た。

化合物4: 白色粉末. mp 99-102 °C (CH₂Cl₂-ヘキサン). $[\alpha]_D^{23}$ -26.7 ° (c = 1.0, CHCl₃). IR ν (KBr): 3059, 1691, 1460, 1362, 1269, 1218, 1177 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 2.41 (3H, s), 3.25 (1H, br), 3.79 (2H, m), 4.19

(2H, s), 5.09 (1H, d, $J = 7$ Hz), 5.28 (1H, dd, $J = 3, 7$ Hz), 5.60 (1H, d, $J = 4$ Hz), 5.73 (1H, d, $J = 8$ Hz), 5.94 (1H, s), 7.24 (1H, d, $J = 8$ Hz), 7.38 (2H, d, $J = 9$ Hz), 7.42 (5H, br), 7.69 (2H, d, $J = 9$ Hz), 9.11 (1H, br). ^{13}C -NMR (CDCl_3): δ 21.6, 63.5, 68.3, 77.2, 82.8, 84.2, 87.7, 94.9, 102.6, 107.5, 126.5, 127.9, 128.5, 129.7, 132.2, 135.0, 143.0, 145.0, 150.4, 163.5.

Anal. Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_9\text{S} \cdot 1/3 \text{H}_2\text{O}$: C, 55.17; H, 4.76; N, 5.36; S, 6.14. Found: C, 55.19; H, 4.66; N, 5.29; S, 5.98.

(4) 3'-O-ベンジル-4'-(p-トルエンスルホンイルオキシメチル)

ウリジン (5) の合成

窒素気流下、化合物 4 (150 mg, 0.29 mmol) のアセトニトリル溶液 (3 ml) にシアノ水素化ホウ素ナトリウム (92 mg, 1.5 mmol) を室温にて加えた。その後、四塩化チタン (0.16 ml, 1.5 mmol) を氷冷下で滴下し室温にて 15 時間攪拌した。反応液をクロロホルムに希釈して飽和重曹水、水、飽和食塩水で洗浄したのち有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒留去後シリカゲルカラムクロマトグラフィー ($\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 25:1$) により精製し、化合物 5 (112 mg, 0.22 mmol, 75%) を得た。

化合物 5: 無色結晶, mp 195-197°C (AcOEt-ヘキサン). $[\alpha]_D^{23} -14.6^\circ$ ($c = 1.0$, CHCl_3). IR ν (KBr): 3033, 2885, 2820, 1726, 1470, 1361, 1274, 1175, 1119 cm^{-1} . ^1H -NMR (CDCl_3) δ : 2.40 (3H, s), 3.59-3.77 (3H, m), 4.10, 4.24 (2H, AB, $J = 11$ Hz), 4.32 (1H, d, $J = 6$ Hz), 4.56 (2H, m), 4.69 (1H, d, $J = 11$ Hz), 5.52 (1H, d, $J = 6$ Hz), 5.67 (1H, d, $J = 8$ Hz), 7.24-7.29 (7H, m), 7.48 (1H, d, $J = 8$ Hz), 7.70 (2H, d, $J = 9$ Hz), 9.91 (1H, s). ^{13}C -NMR (CDCl_3): δ 21.6, 63.2, 69.2, 73.6, 74.6, 78.1, 86.6, 92.9, 102.5, 127.9, 128.2, 128.3, 128.6, 129.9, 132.3, 136.9, 142.4, 145.2, 150.7, 163.8.

Anal. Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_9\text{S}$: C, 55.59; H, 5.05; N, 5.40; S, 6.18. Found: C, 55.41; H, 5.02; N, 5.32; S, 6.15.

(5) 3'-O-ベンジル-2'-O, 4'-C-メチレンウリジン (6) の合成

窒素気流下、化合物 5 (80 mg, 0.16 mmol) の無水 THF 溶液 (1.5 ml) に室温で NaHMDS (3.2 mmol) の無水ベンゼン懸濁液 (0.7 ml) を加え、室温で 20 時間攪拌した。反応溶液に飽和重曹水を加え、CHCl₃ にて抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムにて乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃ : MeOH = 10:1) にて精製後、MeOH にて再結晶し、化合物 6 (41 mg, 0.10 mmol, 61%) を得た。

化合物 6: 無色結晶. mp 217-219 °C (MeOH). $[\alpha]_D^{23} +108.4^\circ$ (c = 0.3, MeOH). IR ν (KBr): 3059, 2951, 1688, 1459, 1271, 1053 cm⁻¹. ¹H-NMR (d₆-DMSO) δ : 3.75, 3.85 (2H, AB, J = 8 Hz), 3.77 (2H, d, J = 5 Hz), 3.92 (1H, s), 4.44 (1H, s), 4.60 (2H, s), 5.39 (1H, t, J = 5 Hz), 5.48 (1H, s), 7.31 (5H, m), 7.72 (1H, d, J = 8 Hz), 11.37 (1H, s). ¹³C-NMR (d₆-DMSO): δ 56.0, 71.1, 71.6, 75.8, 76.5, 86.5, 88.3, 100.9, 127.4, 127.6, 128.2, 137.9, 139.0, 150.0, 163.3. Mass(EI): m/z 346 (M⁺, 1.1).

Anal. Calcd. for C₁₇H₁₈N₂O₆: C, 58.96; H, 5.24; N, 8.09.

Found: C, 58.67; H, 5.23; N, 8.05.

(6) 2'-O, 4'-C-メチレンウリジン (7) の合成

化合物 6 (25 mg, 0.072 mmol) のメタノール溶液 (2.5 ml) に 10% Pd-C (25 mg) を加え、水素気流下、常圧にて 15 時間攪拌した。反応液を濾過し、溶媒留去後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃ : MeOH = 10:1 then 5:1) にて精製し、7 (18.3 mg, quant.) を得た。

化合物 7: 無色結晶. mp 239-243 °C (MeOH). $[\alpha]_D^{23} +92.2^\circ$ (c = 0.3, MeOH). IR ν (KBr): 3331, 3091, 3059, 2961, 1689, 1463, 1272, 1049 cm⁻¹.

¹H-NMR (CD₃OD) δ : 3.76, 3.96 (2H, AB, J = 8 Hz), 3.90 (2H, s), 4.04 (1H, s), 4.28 (1H, s), 5.55 (1H, s), 5.69 (1H, d, J = 8 Hz), 7.88 (1H, d, J = 8 Hz).

Anal. Calcd. for C₁₆H₁₂N₂O₆: C, 46.88; H, 4.72; N, 10.93.

Found: C, 46.74; H, 4.70; N, 10.84.

(7) 5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-O,4'-C-メチレン
ウリジン (8) の合成

化合物 7 (140 mg, 0.53 mmol) に無水ピリジンを加えて 3 回共沸した後、無
水ピリジン溶液 (1.5 ml) とし、窒素気流下、室温で 4,4'-ジメトキシトリチ
ルクロリド (210 mg, 0.63 mmol)、DMA P (6.5 mg, 0.053 mmol) を加え室温
5 で 5 時間攪拌した。反応溶液に飽和重曹水を加えた後、CH₂Cl₂ で抽出した。有
機層を水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムにて乾燥した。溶媒を減圧
留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃: MeOH
= 40:1) により精製し、化合物 8 (230 mg, 0.34 mmol, 66%) を得た。

10 化合物 8: 白色粉末. mp 117-120 °C (CHCl₃). [α]_D²³+17.2° (c = 1.0,
CHCl₃). IR ν (KBr): 3393, 3101, 2885, 1689, 1464, 1272, 1047 cm⁻¹. ¹H-N
MR (CDCl₃) δ : 2.59 (1H, br), 3.56 (2H, q, J = 7, 11 Hz), 3.87 (1H, d, J
= 7 Hz), 4.26 (1H, s), 4.47 (1H, s), 5.60 (1H, d, J = 9 Hz), 5.63 (1H,
s), 5.84 (4H, d, J = 9 Hz), 7.22-7.45 (9H, m), 7.93 (1H, d, J = 9 Hz).

15 [実施例 2] ヌクレオシド類縁体の合成

(1) メチル=5-O-(t-ブチルジフェニルシリル)-4-ヒドロキシ
メチル-2,3-O-イソプロピリデン- β -D-リボフラノシド

(14) の合成

窒素気流下、文献既知化合物 13 (2.00g, 8.54mmol) の無水 CH₂Cl₂ 溶液 (40
20 ml) に氷冷下で Et₃N (2.62ml, 18.8mmol)、t-ブチルジフェニルシリルクロリド (4.
88ml, 18.8mmol) を加え、室温で 13 時間攪拌した。反応溶液に飽和重曹水を加え
た後、AcOEt で 3 回抽出した。有機層を飽和食塩水で 1 回洗浄後、無水 Na₂SO₄ に
て乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマト
グラフィー (ヘキサン: AcOEt=5:1) により精製し、無色油状物質 14 (2.82g, 5.9
25 8mmol, 70%) を得た。

[α]_D¹⁷-16.2° (c=0.52, CHCl₃) IR ν (KBr): 3510, 3061, 2938, 2852, 1465, 110
3cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 1.09 (9H, s), 1.28 (3H, s), 1.49 (3H, s), 3.22 (3H,

s), 3.67, 3.76(2H, AB, J=11Hz), 3.88, 3.93(2H, AB, J=11Hz), 4.49(1H, d, J=6Hz), 4.57(1H, d, J=6Hz), 4.93(1H, s), 7.38-7.43(6H, m), 7.67(4H, d, J=7Hz).

^{13}C -NMR (CDCl₃) δ : 19.2, 24.4, 25.9, 26.9, 55.0, 62.9, 64.8, 82.2, 85.9, 88.7, 108.6, 112.6, 127.8, 129.9, 133.0, 135.7.

5 Anal. Calcd for C₂₆H₃₆O₈Si · 1/4 H₂O: C, 65.45; H, 7.71. Found: C, 65.43; H, 7.59.

(2) メチル=5-O-(*t*-ブチルジフェニルシリル)-2,3-O-
イソプロピリデン-4-(*p*-トルエンスルホニルオキシメチル)-
-β-リボフラノシド(15)の合成

10 窒素気流下、化合物(2, 13g, 4.51mmol)の無水CH₂Cl₂溶液(15ml)に室温でEt₃N(3.92g, 28.0mmol)、*p*-トルエンスルホニルクロリド(1.34g, 7.22mmol)、4-ジメチルアミノピリジン(90mg, 0.72mmol)を加え、室温で17時間攪拌した。反応溶液に飽和重曹水を加えた後、AcOEtで3回抽出した。有機層を飽和食塩水で1回洗浄後、無水Na₂SO₄にて乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン:AcOEt=10:1)により精製し、無色油状物質15(2.76g, 4.42mmol, 98%)を得た。

15 $[\alpha]_D^{17}$ -3.82° (c=0.56, CHCl₃) IR ν (KBr): 2934, 2852, 1369, 1104cm⁻¹.

^1H -NMR (CDCl₃) δ : 1.02(9H, s), 1.20(3H, s), 1.32(3H, s), 2.41(3H, s), 3.09(3H, s), 3.51, 3.77(2H, AB, J=10Hz), 4.34(1H, d, J=6Hz), 4.25, 4.39(2H, AB, J=9Hz), 4.47(1H, d, J=6Hz), 4.77(1H, s), 7.28, 7.81(4H, AB, J=9Hz), 7.39-7.44(6H, m), 7.62-7.65(4H, m), 7.81(2H, d, J=9Hz).

20 ^{13}C -NMR (CDCl₃) δ : 19.2, 21.6, 24.5, 25.8, 26.8, 54.9, 62.7, 68.8, 81.9, 85.6, 87.5, 108.7, 112.8, 127.7, 127.8, 128.2, 129.6, 129.9, 132.9, 135.6, 144.4.

25 Anal. Calcd for C₃₃H₄₂O₈SSi: C, 63.23; H, 6.75; S, 5.11. Found: C, 62.99; H, 6.53; S, 5.13.

(3) メチル=5-O-(*t*-ブチルジフェニルシリル)-4-(*p*-トルエンスルホニルオキシメチル)-β-D-リボフラノシド(16)の合成

化合物 1 5 (645mg, 1.03mmol) の THF-H₂O [11ml, 8:3(v/v)] 溶液に室温でトリフロロ酢酸(14ml)を加え、室温で 20 分撹拌した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成
績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane:AcOEt=5:1) により精製し、
無色油状物質 1 6 (464mg, 0.79mmol, 77%) を得た。

5 $[\alpha]_D^{25} -35.8^\circ$ (c=1.90, CHCl₃) IR ν (KBr): 3499, 3051, 2931, 2840, 1594, 146
8, 1362, 1109cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 1.02(9H, s), 2.42(3H, s), 3.16(3H, s), 3.54,
3.70(2H, AB, J=10Hz), 3.97(1H, d, J=5Hz), 4.18(1H, d, J=5Hz), 4.26, 4.39(2H, AB,
J=10Hz), 4.73(1H, s), 7.30(2H, d, J=8Hz), 7.36-7.44(6H, m), 7.59-7.66(4H, m),
10 7.78(2H, d, J=8Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ : 19.2, 21.6, 26.7, 55.2, 66.5, 69.6, 74.0,
75.2, 76.5, 84.8, 107.5, 127.7, 128.0, 129.8, 132.6, 132.7, 132.8, 135.5,
135.6, 144.9.

Anal. Calcd for C₃₀H₃₈SSiO₈·1/4 H₂O: C, 60.94; H, 6.56. Found: C, 60.94; H, 6.4

15 3.

(4) メチル=5-O-(*t*-ブチルジフェニルシリル)-2-O, 4-C-
メチレン- β -D-リボフラノシド (17) 及び
メチル=5-O-(*t*-ブチルジフェニルシリル)-3-O, 4-C-
メチレン- β -D-リボフラノシド (18) の合成

20 窒素気流下、化合物 1 6 (194mg, 0.33mmol) の無水 THF 溶液 (4ml) に室温で
NaHMDS (3.30mmol) の benzene 懸濁液 (1.6ml) を加え、室温で 1 時間撹拌した。反
応溶液に飽和重曹水を加えた後、反応溶媒を留去し、AcOEt で 3 回抽出した。有
機層を飽和食塩水で 1 回洗浄後、無水 Na₂SO₄ にて乾燥した。溶媒を減圧留去し、
得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:AcOEt=5:
25 1) により精製し、無色油状物質 1 7 (48mg, 0.116mmol, 35%) 及び無色油状物質 1
8 (59mg, 0.142mmol, 43%) を得た。

化合物 1 7: IR ν (KBr): 3438, 3064, 1103, 1036cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 1.08(9H, s), 2.04(1H, br s), 3.39(3H, s), 3.65,

3.98(2H, AB, J=8Hz), 3.95, 4.02(2H, AB, J=12Hz), 4.02(1H, s), 4.30(1H, s), 4.79(1H, s), 7.38-7.46(6H, m), 7.65-7.69(4H, m).

^{13}C -NMR (CDCl₃) δ : 19.2, 26.7, 55.0, 60.7, 71.2, 73.1, 79.9, 85.5, 104.3, 127.8, 129.9, 130.0, 132.9, 135.6, 135.7.

5 Anal. Calcd for C₂₃H₃₀O₅Si·1/4 H₂O: C, 65.68; H, 7.34. Found: C, 65.98; H, 7.23.
化合物 18: IR ν (KBr): 3456, 3058, 2938, 2852, 1467, 1108cm⁻¹.

^1H -NMR (CDCl₃) δ : 1.10(9H, s), 3.26(3H, s), 3.71(2H, s), 4.02(1H, d, J=6Hz), 4.35, 4.95(2H, d, J=7Hz), 5.01(1H, s), 5.11(1H, d, J=6Hz), 7.38-7.44(6H, m), 7.66(4H, d, J=7Hz).

10 ^{13}C -NMR (CDCl₃) δ : 19.3, 26.8, 55.4, 63.7, 75.1, 77.9, 84.5, 86.3, 111.9, 127.8, 128.0, 129.9, 132.9, 133.0, 135.6, 135.8, 135.9.

Anal. Calcd for C₂₃H₃₀O₅Si·1/4 H₂O: C, 65.91; H, 7.34. Found: C, 66.07; H, 7.14.

(5) メチル=3- O -アセチル-5- O -(t -ブチルジフェニルシリル)-2- O , 4- C -メチレン- β -D-リボフラノシド (19)

15 の合成

窒素気流下、化合物 17 (704mg, 1.70mmol) の無水ピリジン溶液 (10ml) に室温で無水酢酸 (0.38ml, 4.08mmol)、4-ジメチルアミノピリジン (21mg, 0.170mmol) を加え、室温で 3 時間攪拌した。反応溶液に飽和重曹水を加えた後、AcOEt で 3 回抽出した。有機層を飽和食塩水で 1 回洗浄後、無水 Na₂SO₄ にて乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン: AcOEt=7:1) により精製し、無色油状物質 19 (665mg, 1.46mmol, 86%) を得た。
[α]_D¹⁷ -34.3° (c=0.93, CHCl₃) IR ν (KBr): 3438, 3064, 2934, 1749, 1468, 1103, 1036cm⁻¹.

25 ^1H -NMR (CDCl₃) δ : 0.99(9H, s), 1.97(3H, s), 3.34(3H, s), 3.69, 3.86(2H, AB, J=8Hz), 3.86(2H, s), 4.17(1H, s), 4.77(1H, s), 5.06(1H, s), 7.28-7.39(6H, m), 7.58-7.63(4H, m).

^{13}C -NMR (CDCl₃) δ : 19.3, 20.9, 26.7, 55.0, 60.3, 72.0, 73.6, 78.3, 85.3, 104.4, 127.7, 129.8, 133.0, 135.6, 169.8.

Anal. Calcd for $C_{25}H_{32}O_6Si \cdot 1/4 H_2O$: C, 65.12; H, 7.10. Found: C, 65.27; H, 7.00.

(6) 5'-O-(*t*-ブチルジフェニルシリル)-2'-O, 4'-C-メチレン-5-メチルウリジン (20) の合成

- 窒素気流下、化合物 19 (109.2g, 0.239mmol) の無水 CH_3CN 溶液 (2ml) に室温で O, O'-ビストリメチルシリルチミン (154mg, 0.598mmol) を加えた後、氷冷下でトリメチルシリルトリフルオロメタンスルホネート (0.82ml, 8.74mmol) の 1,1-ジクロロエタン (0.31ml) 溶液を加え、室温で 18 時間攪拌した。反応溶液を CH_2Cl_2 で希釈し、飽和重曹水を加えた後、AcOEt で 3 回抽出した。有機層を飽和食塩水で 1 回洗浄後、無水 Na_2SO_4 にて乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン: AcOEt=3:1) により精製し、無色油状物質 20 (87.7mg, 0.173mmol, 70%) を得た。
- IR ν (KBr): 3048, 2935, 2852, 1749, 1466, 1369, 1234, 1108, 1040 cm^{-1} .
- 1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 1.06(9H, s), 1.94(3H, s), 2.98(1H, br s), 3.63, 4.00(2H, AB, $J=10Hz$), 3.72(1H, d, $J=7Hz$), 3.82-3.84(2H, m), 4.30(1H, s), 5.25(1H, s), 7.40-7.46(6H, m), 7.60(4H, d, $J=6Hz$), 7.66(1H, s), 9.68(1H, br s).

〔実施例 3〕ヌクレオシド類縁体の合成（別法）

(1) 3-*O*-ベンジル-5-*O*-(*t*-ブチルジフェニルシリル)-4-(ヒドロキシメチル)-1, 2-*O*-イソプロピリデン- α -D-エリスロペンチフラノース (32) の合成

5 窒素気流下、氷冷下で前記文献 5) に従って調整した化合物 31 (2.50 g, 8.08 mmol) の塩化メチレン溶液 (50 ml) に、トリエチルアミン (3.71 ml, 26.6 mmol)、*t*-ブチルジフェニルシリルクロリド (6.94 ml, 26.7 mmol) を加え、室温で 10.5 時間攪拌した。反応溶液に飽和重曹水を加えた後、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (AcOEt-ヘキサン、1:4 \rightarrow 1:3) により精製し、白色固体 (32) (2.97 g, 5.41 mmol, 67 %) を得た。

mp. 98 - 99 °C (ヘキサン). $[\alpha]_D^{20} + 54.8^\circ$ ($c = 1.12$, アセトン). IR ν_{\max} (KBr): 3553, 2936, 1463, 1379, 1107 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.13 (9H, s), 1.50 (3H, s), 1.78 (3H, s), 2.56 (1H, t, $J = 7$ Hz), 3.82, 3.92 (2H, AB, $J = 11$ Hz), 3.94 (2H, t, $J = 6$ Hz), 4.57 (1H, d, $J = 5$ Hz), 4.64, 4.95 (2H, AB, $J = 12$ Hz), 4.83 (1H, dd, $J = 4, 5$ Hz), 5.95 (1H, d, $J = 4$ Hz), 7.44-7.55 (11H, m), 7.72-7.78 (4H, m). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 19.2, 26.2, 26.5, 26.8, 63.2, 65.4, 72.5, 77.9, 79.1, 87.4, 104.4, 113.7, 127.6, 127.7, 128.0, 128.5, 129.5, 129.7, 132.9, 133.1, 134.7, 135.5, 137.2.

Anal. Calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{40}\text{O}_6\text{Si}$: C, 70.04; H, 7.38. Found: C, 70.19; H, 7.35.

25 (2) 3-*O*-ベンジル-5-*O*-(*t*-ブチルジフェニルシリル)-4-(*p*-トルエンスルホニルオキシメチル)-1, 2- α -D-エリスロペンチフラノース (33) の合成

窒素気流下、氷冷下で 32 (250 mg, 0.456 mmol) の塩化メチレン溶液に、トリエチルアミン (395 μl , 2.83 mmol)、*p*-トルエンスルホニルクロリド (139.2

mg, 0.730 mmol) 及び 4-ジメチルアミノピリジン (8.92 mg, 0.0730 mmol) を
加え、室温で 15.5 時間攪拌した。反応溶液に飽和重曹水を加えた後、酢酸エチ
ルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムにて乾燥した。溶
媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Ac
5 OEt-ヘキサン, 1:6) により精製し、淡黄色油状物質 (33) (310.6 mg, 0.442
mmol, 97 %) を得た。

$[\alpha]_D^{20} + 16.0^\circ$ (c = 0.44, アセトン). IR ν_{\max} (KBr) : 2935, 1595, 146
2, 1363, 1174, 1106 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.08 (9H, s), 1.40 (3H, s),
1.46 (3H, s), 2.48 (3H, s), 3.68, 3.83 (2H, AB, J = 11 Hz), 4.45 (2H,
10 dd, J = 4, 5 Hz), 4.64, 4.81 (2H, AB, J = 12 Hz), 4.68 (1H, dd, J = 4, 5
Hz), 5.81 (1H, d, J = 4 Hz), 7.32 (2H, d, J = 8 Hz), 7.42-7.72 (15H, m),
7.82, (2H, d, J = 8 Hz), 7.66 (4H, m), 7.72 (2H, d, J = 8 Hz). $^{13}\text{C-NMR}$
(CDCl_3) δ : 19.1, 21.5, 26.1, 26.4, 26.7, 64.4, 70.0, 72.5, 78.1, 78.9,
85.4, 104.2, 113.6, 127.3, 127.7, 127.9, 128.0, 128.4, 129.6, 129.7, 12
15 9.8, 132.7, 132.8, 135.5, 137.2, 144.4. MS (EI) m/z : 646 ($\text{M}^+ - \text{t-Bu}$). Hi
gh-MS (EI) : Calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{37}\text{O}_8\text{SSi}$ ($\text{M}^+ - \text{t-Bu}$) : 645.1978, Found : 645.19
69.

(3) 1, 2-ジ-*O*-アセチル-3-*O*-ベンジル-5-*O*-*t*-ブチルジ
フェニルシリル-4- (p-トルエンシルホニルオキシメチル) - α -
20 および- β -D-リボフラノース (34) の合成

窒素気流下、34 (3.70 g, 5.27 mmol) の酢酸溶液 (56 ml) に無水酢酸 (6.
0 ml, 63.6 mmol) 及び濃硫酸 (56 μl , 1.10 μmol) を加え、室温で 2 時間攪
拌した。反応溶液を氷水 (300 ml) にあけて 30 分間攪拌した後、飽和食塩水を
加え、酢酸エチルで抽出した後、有機層を硫酸マグネシウムにて乾燥した。溶媒
25 を留去して得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (AcOEt-ヘ
キサン, 2:1) により精製し、黄色油状物質 (34) (3.36 g, 4.53 mmol, 86 %)
を α : β = 1:4 の混合物として得た。

IR ν_{\max} (KBr) : 2934, 2863, 1751, 1365, 1217, 1106 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3)

[β 体] δ : 1.02 (9H, s), 1.77 (3H, s), 1.98 (3H, s), 2.39 (3H, s), 3.61, 3.76 (2H, AB, $J = 11$ Hz), 4.21-4.58 (5H, m), 5.26 (1H, d, $J = 5$ Hz), 5.94 (1H, s), 7.15-7.59 (13H, m), 7.58-7.66 (4H, m), 7.72 (2H, d, $J = 8$ Hz)

[α 体] δ : 1.02 (9H, s), 1.98 (3H, s), 2.36 (3H, s), 3.48, 3.58 (2H, AB, $J = 11$ Hz), 4.21-4.58 (5H, m), 5.12 (1H, dd, $J = 5, 6$ Hz), 6.33 (1H, d, $J = 5$ Hz), 7.15-7.59 (13H, m), 7.58-7.66 (4H, m), 7.72 (2H, d, $J = 8$ Hz)

^{13}C -NMR (CDCl_3) δ : 14.2, 19.3, 20.5, 20.8, 21.6, 26.7, 26.8, 60.3, 64.8, 69.1, 73.6, 74.1, 78.6, 85.3, 97.4, 127.4, 127.6, 127.7, 127.8, 127.9, 128.0, 128.2, 128.3, 128.4, 129.5, 129.6, 1289.8, 129.9, 132.4, 132.8,

132.9, 135.4, 135.5, 135.6, 136.9, 144.5, 168.7, 169.4. High-MS(FAB):

Calcd for $\text{C}_{40}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{SSiNa}$ ($\text{M}^+ + \text{Na}$): 769.2479, Found: 769.2484.

(4) 2'- O -アセチル-3'- O -ベンジル-5'- O - t -ブチルジフェニルシリル-4'- p -トルエンスルホニルオキシメチル-5-メチルウリジン (35) の合成

窒素気流下、氷冷下で 34 (1.88g, 2.52 mmol) の 1,2-ジクロロエタン溶液 (26 ml) に 2TMS \cdot T (1.04 g, 4.03 mmol) 及びトリメチルシリルトリフルオロメタンスルホナート (730 μ l, 4.03 mmol) を加え、室温で 17 時間攪拌した。反応溶液に飽和重曹水を加え、セライト濾過した後、母液をクロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムにて乾燥した。溶媒を減圧留去して得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (AcOEt-ヘキサン, 2:3) により精製し、白色粉末 (35) (2.00 g, 2.44 mmol, 97 %) を得た。

mp. 70 - 71.5 $^{\circ}\text{C}$. [α] $_{\text{D}}^{24} + 4.58^{\circ}$ ($c = 1.25$, アセトン). IR ν_{max} (KBr): 3059, 2934, 1694, 1465, 1368, 704 cm^{-1} . ^1H -NMR (CDCl_3) δ : 1.18 (9H, s), 1.63 (3H, d, $J = 1$ Hz), 2.10 (3H, s), 2.42 (3H, s), 3.73, 3.86 (2H, AB, $J = 11$ Hz), 4.12, 4.20 (2H, AB, $J = 11$ Hz), 4.44, 4.57 (2H, AB, $J = 11$ Hz), 4.45 (1H, d, $J = 6$ Hz), 5.38 (1H, t, $J = 6$ Hz), 6.02 (1H, d, $J = 6$ Hz), 7.21-7.60 (13H, m), 7.62-7.69 (7H, m), 8.91 (1H, br s). ^{13}C -NMR

(CDCl₃) δ_c : 11.9, 19.3, 20.6, 21.6, 27.0, 65.3, 68.6, 74.1, 74.8, 77.2, 77.3, 86.0, 86.4, 111.6, 127.9, 128.0, 128.2, 128.5, 129.7, 130.1, 130.2, 131.8, 132.3, 132.5, 135.3, 135.5, 135.6, 136.8, 144.9, 150.2, 163.4, 170.2. MS (FAB) m/z : 813 ($M^+ + H$).

5 Anal. Calcd for C₄₃H₄₈N₂O₁₀SSi·2H₂O: C, 60.83; H, 6.17; N, 3.30. Found: C, 60.55; H, 5.78; N, 3.22.

(5) 3'-O-ベンジル-5'-O-t-ブチルジフェニルシリル-4'-p-
ートルエンスルホニルオキシメチル-5-メチルウリジン (36) の合成

10 氷冷下、35 (250 mg, 0.308 mmol) のメチルアルコール溶液 (4 ml) に炭酸
カリウム (12.75 mg, 0.0923 mmol) 及び水 (0.5 ml) を加え、室温で 22 時間
攪拌した。氷冷下、反応溶液に酢酸を加えて中和した後、溶媒を減圧留去した。
残渣に水を加えた後、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、
硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去した後、得られた粗成績体をシリカ
15 ゲルカラムクロマトグラフィー (AcOEt-ヘキサン, 3:2) により精製し、白色粉
末 (36) (216.7 mg, 0.283 mmol, 92 %) を得た。

mp. 74 - 77 °C. [α]_D²³ + 5.15° (c = 1.23, CHCl₃). IR ν_{max} (KBr): 3048, 2934, 1695, 1363, 1181, 1108, 977, 819, 704 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 1.05 (9H, s), 1.65 (3H, d, J = 1 Hz), 2.39 (3H, s), 3.04 (1H, br d, J = 9 Hz), 3.72 (2H, s), 4.17 (2H, s), 4.18 (1H, d, J = 5 Hz), 4.24-4.32 (1H, m), 4.54, 4.62 (2H, AB, J = 11 Hz), 5.62 (1H, d, J = 6 Hz), 7.19-7.69 (20H, m), 8.46 (1H, br s). ¹³C-NMR (CDCl₃) δ_c : 12.1, 19.4, 26.9, 58.8, 72.0, 72.2, 75.8, 76.7, 87.4, 88.8, 110.4, 127.7, 12.79, 128.1, 128.2, 128.5, 128.7, 129.8, 130.0, 130.1, 132.2, 134.3, 135.3, 135.5, 136.8, 149.8, 163.9. MS (FAB) m/z : 771 ($M^+ + H$).

25 Anal. Calcd for C₄₁H₄₈N₂O₉SSi: C, 63.41; H, 6.16; N, 3.51; S, 3.95.
Found: C, 63.87; H, 6.01; N, 3.63; S, 4.16.

(6) 3'-O-ベンジル-5'-O-t-ブチルジフェニルシリル-2'-O-

4'-C-メチレン-5-メチルウリジン (37) の合成

窒素気流下、氷冷下で 36 (1.86 g, 2.42 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (30 ml) にナトリウムビス (トリメチルシリル) アミド (1.0 M in THF, 8.47 ml, 8.47 mmol) を加え、室温で 1 時間攪拌した。反応溶液に飽和重曹水 (14 ml)

5 を加えた後、溶媒を減圧留去した。残渣に水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムにて乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (AcOEt-ヘキサン, 2:3) により精製し、白色粉末 (37) (1.42 g, 2.37 mmol, 98 %) を得た。mp. 70.5- 72 °C. $[\alpha]_D^{25} + 52.47^\circ$ (c = 1.025, アセトン). IR ν_{\max} (KBr)

10 : 2936, 1694, 1465, 1275, 1106, 1055, 809, 704 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.21 (9H, s), 1.76 (3H, s), 3.88, 4.07 (2H, AB, J = 8 Hz), 4.07, 4.15 (2H, AB, J = 11 Hz), 4.16 (1H, s), 4.66, 4.80 (2H, AB, J = 11 Hz), 4.76 (1H, s), 7.34-7.79 (16H, m), 10.0 (1H, br s). MS (FAB) m/z : 599 (M^+H).
Anal. Calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_6\text{Si} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: C, 64.33; H, 6.03; N, 4.41. Found :
15 C, 64.58; H, 6.15; N, 4.28.

(7) 3'-O-ベンジル-2'-O-, 4'-C-メチレン-5-メチルウリジン (38) の合成

窒素気流下、37 (188.7 mg, 0.316 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (1 ml) に、テトラブチルアンモニウムフルオリド (1.0 M in THF, 379 μl , 0.379 mmol) を加え、室温で 2.5 時間攪拌した。反応溶液を減圧留去して得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (AcOEt-ヘキサン, 1:1→1:0) により精製し、白色粉末 (38) (94.6 mg, 0.262 mmol, 83 %) を得た。

IR ν_{\max} (KBr) : 3424, 3183, 3063, 2950, 1691, 1463, 1273, 1057, 734 cm^{-1} .

25 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.90 (3H, d, J = 1 Hz), 3.83, 4.05 (2H, AB, J = 8 Hz), 3.93, 4.02 (2H, AB, J = 12 Hz), 3.94 (1H, s), 4.53 (1H, s), 4.56, 4.58 (2H, AB, J = 12 Hz), 5.65 (1H, s), 7.32 (5H, s), 7.44 (1H, d, J = 1 Hz).

High-MS (EI) :

Calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{NO}_6$ (M^+) : 360.1321. Found : 360.1312.

(8) 2'-O, 4'-C-メチレン-5-メチレンウリジン (39a) の合成
化合物 38 (86.5 mg, 0.240 mmol) のメチルアルコール溶液 (4 ml) に 20 %
Pd(OH)₂-C (86.5 mg) を加え、水素気流下常圧にて 14.5 時間攪拌した。反応溶
液を濾過した後、溶媒を減圧留去して無色結晶 (39) (62.5 mg, 0.230 mmol,
5 96 %) を得た。

mp. 194-195 °C. $[\alpha]_D^{20} + 53.7^\circ$ (c = 1.02, EtOH). IR ν_{\max} (KBr) : 332
3, 3163, 3027, 2889, 2826, 1689, 1471, 1276, 1057 cm⁻¹. ¹H-NMR (CD₃OD)
 δ : 1.89 (3H, q, J = 1 Hz), 3.74, 3.95 (2H, AB, J = 8 Hz), 3.90 (1H, s),
4.07 (1H, s), 4.26 (1H, s), 5.53 (1H, s), 7.74 (1H, d, J = 1 Hz). ¹³C-
10 NMR (CD₃OD) δ_c : 12.6, 57.6, 70.3, 72.4, 80.8, 88.3, 90.4, 110.7, 136.8,
151.8, 166.5.

[実施例 4]

(1) 2'-O-アセチル-3'-O-ベンジル-5'-O-t-ブチルジフェ
ニルシリル-4'-p-トルエンスルホニルオキシメチル-N⁶-ベンゾ
15 イルアデノシン (40) の合成

文献 6) (H. Vorbruggen, K. Krolikiewicz and B. Bennua, Chem., Ber., 114,
1234-1255 (1981)) に従って調整した 2TMS·A^{Bz} (128.7 mg, 0.336 mmol) に窒
素気流下、室温で 34 (250 mg, 0.336 mmol) の 1, 2-ジクロロエタン溶液 (5.0
ml) 及びトリメチルシリルトリフルオロメタンスルホナート (6.7 μ l, 0.0336
20 mmol) を加え、26 時間加熱還流した。反応溶液に飽和重曹水を加えた後、塩化
メチレンで 3 回抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムにて
乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグ
ラフィー (CHCl₃-MeOH, 30:1) により精製し、白色粉末 (40) (234.5 mg, 0.
253 mmol, 75 %) を得た。

25 mp. 77-78 °C (AcOEt / ヘキサン). $[\alpha]_D^{24} - 13.2^\circ$ (c = 1.00, CHCl₃). IR
 ν_{\max} (KBr) : 3058, 2934, 1749, 1703, 1606, 1105 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃)
 δ : 0.99 (9H, s), 2.04 (3H, s), 2.38 (3H, s), 3.74, 3.85 (2H, AB, J = 1
1 Hz), 4.31, 4.43 (2H, AB, J = 11 Hz), 4.52, 4.58 (2H, AB, J = 11 Hz),

4.81 (1H, d, $J = 6$ Hz), 5.94 (1H, d, $J = 6$ Hz), 6.04 (1H, d, $J = 5$ Hz),
 7.18 - 7.61 (20H, m), 7.69 (2H, d, $J = 8$ Hz), 7.99 (1H, s), 8.01 (2H, d,
 $J = 7$ Hz), 8.56 (1H, s), 8.99 (1H, br s). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ c: 19.1, 20.
 5 127.8, 127.9, 128.1, 128.5, 128.8, 129.6, 129.9, 132.0, 132.3, 132.6, 1
 32.7, 133.5, 135.4, 135.5, 136.8, 142.0, 144.7, 149.6, 151.2, 152.6, 164.
 5, 169.8. MS (FAB) m/z : 926 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

(2) 3'-O-ベンジル-5'-O-t-ブチルジフェニルシリル-4'-p
 トルエンスルホニルオキシメチル-N⁶-ベンゾイルアデノシン (41)

10 の合成

化合物 40 (167.9 mg, 0.182 mmol) のメチルアルコール溶液 (3.0 ml) に室
 温で炭酸カリウム (15.0 mg, 0.109 mmol) を加えた後、室温で 15 分攪拌した。
 反応溶液に濃塩酸を加えて溶液を中和した後、塩化メチレンで 3 回抽出した。
 有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムにて乾燥した。溶媒を減圧留去し、
 15 得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl_3 -MeOH, 30:1)

により精製し、白色粉末 (41) (140.5 mg, 0.160 mmol, 88 %) を得た。

mp. 82-83 °C (AcOEt-ヘキサン). $[\alpha]_{\text{D}}^{25} - 6.02^\circ$ ($c = 0.96$, CHCl_3). IR
 ν_{max} (KBr): 3306, 3066, 2935, 2859, 1701, 1611 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3)
 δ : 0.98 (9H, s), 2.37 (3H, s), 3.76 (2H, s), 4.39, 4.45 (1H, AB, $J = 11$
 20 Hz), 4.54 (1H, d, $J = 6$ Hz), 4.67, 4.76 (2H, AB, $J = 11$ Hz), 4.85 (1H,
 dd, $J = 5, 6$ Hz), 5.79 (1H, d, $J = 5$ Hz), 7.20 - 7.58 (21H, m), 7.73 (2H,
 d, $J = 8$ Hz), 7.80 (1H, s), 7.96 (2H, d, $J = 8$ Hz), 8.49 (1H, s), 9.18
 (1H, br s). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ c: 19.1, 21.6, 26.8, 64.4, 68.9, 74.1, 74.
 6, 79.2, 86.8, 89.8, 123.1, 127.7, 127.8, 128.0, 128.2, 128.4, 128.6, 12
 25 8.8, 129.7, 130.0, 132.1, 132.5, 132.6, 132.8, 133.4, 135.4, 135.5, 136.
 8, 142.1, 144.8, 149.4, 152.3, 164.5.

(3) 3'-O-ベンジル-5'-O-t-ブチルジフェニルシリル-2'-O,
 4'-C-メチレン-N⁶-ベンジルアデノシン (42) の合成

窒素気流下、4 1 (210.5 mg, 0.238 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (8.0 ml) に室温でナトリウムビス (トリメチルシリル) アミド (1.0 M in THF, 0.58 ml, 0.572 mmol) を加えた後、室温で 3 時間攪拌した。反応溶液に飽和重曹水を加えた後、塩化メチレンで 3 回抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムにて乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃-MeOH, 30:1) により精製し、白色粉末 (4 2) (169.5 mg, 0.238 mmol, quant.) を得た。

mp. 80- 81 °C. IR ν_{\max} (KBr) : 3259, 3064, 2932, 2858, 1703, 1607 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 1.07 (9H, s), 3.95, 4.10 (2H, AB, J = 8 Hz), 4.02 (2H, d, J = 8 Hz), 4.56, 4.64 (2H, AB, J = 12 Hz), 4.26 (1H, s), 4.86 (1H, s), 6.14 (1H, s), 7.26 - 7.70 (18H, m), 8.04 (2H, d, J = 7 Hz), 8.22 (1H, s), 8.78 (1H, s), 9.18 (1H, br s). ¹³C-NMR (CDCl₃) δ c: 19.2, 26.5, 26.8, 29.7, 59.2, 72.4, 72.6, 76.5, 76.8, 86.7, 88.6, 123.4, 127.7, 127.8, 127.9, 128.1, 128.4, 128.8, 129.5, 130.0, 132.4, 132.5, 132.8, 133.5, 134.8, 135.2, 135.5, 135.6, 136.8, 140.4, 152.7.

(4) 3' -O-ベンジル-2' -O, 4' -C-メチレン-N⁶ -ベンゾイル
アデノシン (4 3) の合成

化合物 4 2 (173.6 mg, 0.244 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (7.0 ml) に室温でテトラブチルアンモニウムフルオリド (1.0 M in THF, 1.0 ml, 1.0 mmol) を加え、室温で 25 分攪拌した。反応溶液を減圧留去して得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃-MeOH, 15:1) により精製し、白色粉末 (4 3) (115.4 mg, 0.244 mmol, quant.) を得た。

mp. 154 - 155 °C (Et₂O). IR ν_{\max} (KBr) : 3339, 2944, 1701, 1611 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 3.91, 4.13 (2H, AB, J = 8 Hz), 3.93, 4.01 (2H, AB, J = 12 Hz), 4.38 (1H, s), 4.64 (1H, s), 4.85 (1H, s), 6.08 (1H, s), 7.29 (1H, s), 7.51 (2H, d, J = 8 Hz), 7.58 (1H, d, J = 7 Hz), 8.05 (2H, d, J = 7 Hz), 8.14 (1H, s), 8.75 (1H, s), 9.50 (1H, br s). ¹³C-NMR (CDCl₃) δ c: 57.1, 72.4, 77.0, 77.1, 86.9, 88.6, 122.9, 127.6, 128.0, 128.1, 128.4.

128.7, 132.8, 133.5, 136.9, 140.5, 149.8, 150.5, 152.8, 165.0.

[実施例5]

(1) 2'-O-アセチル-3'-O-ベンジル-5'-O-t-ブチルジフェ
ニルシリル-4'-p-トルエンスルホニルオキシメチル-N²-イソブ
チリルグアノシン (44) の合成

前記の文献 6) に従って調整した 3TMS・G^{18u} (146.8 mg, 0.336 mmol) に窒
素気流下、室温で 4 (250 mg, 0.336 mmol) の 1, 2-ジクロロエタン溶液 (5.0
ml) 及びトリメチルシリルトリフルオロメタンスルホナート (6.7 μ l, 0.0336
mmol) を加え、15 時間加熱還流した。反応溶液に飽和重曹水を加えた後、塩化
メチレンで 3 回抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムにて
乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグ
ラフィー (CHCl₃-MeOH, 30:1) により精製し、白色粉末 (44) (213.6 mg, 0.2
35 mmol, 70 %) を得た。

mp. 96 - 97 °C (AcOEt-ヘキサン). $[\alpha]_D^{24}$ -11.09 ° (c = 0.97, CHCl₃). I
R ν_{\max} (KBr) : 3152, 3065, 2934, 1746, 1681, 1606 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃)
d: 0.96 (9H, s), 1.10 (3H, d, J = 9 Hz), 1.13 (3H, d, J = 9 Hz), 1.98
(3H, s), 2.36 (3H, s), 2.48 (1H, m), 3.65, 3.72 (2H, AB, J = 11 Hz), 4.2
3, 4.43 (2H, AB, J = 11 Hz), 4.47 (2H, s), 4.63 (1H, d, J = 6 Hz), 5.74
(1H, t, J = 6 Hz), 5.96 (1H, d, J = 6 Hz), 7.14 - 7.68 (20H, m), 9.15 (1
H, s), 12.20 (1H, s). ¹³C-NMR (CDCl₃) δ_c : 19.1, 19.3, 19.4, 20.8, 21.9,
27.0, 27.2, 36.5, 64.5, 68.9, 74.4, 74.9, 76.7, 86.1, 86.7, 122.0, 127.
6, 127.7, 127.9, 128.1, 128.3, 128.4, 128.8, 130.1, 130.4, 132.3, 132.7,
132.9, 135.7, 135.8, 137.3, 137.8, 145.2, 147.8, 148.5, 156.2, 170.2, 1
78.8.

(2) 3'-O-ベンジル-5'-O-t-ブチルジフェニルシリル-4'-p-
トルエンスルホニルオキシメチル-N²-イソブチリルグアノシン
(45) の合成

化合物 44 (137.0 mg, 0.151 mmol) のメチルアルコール溶液 (3.0 ml) に窒

温で炭酸カリウム (15.8 mg, 0.113 mmol) を加えた後、室温で 45 分撹拌した。反応溶液に濃塩酸を加えて溶液を中和した後、塩化メチレンで 3 回抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムにて乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃-MeOH, 30:1)

5 により精製し、白色粉末 45 (83.4 mg, 0.097 mmol, 64 %) を得た。

mp. 102 - 103 °C (AcOEt-ヘキサン). $[\alpha]_D^{25} - 2.00^\circ$ ($c = 0.40$, CHCl₃).

IR ν_{\max} (KBr) : 3166, 2932, 1684, 1607 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0.90 (9H, s), 1.09 (3H, d, $J = 7$ Hz), 1.13 (3H, d, $J = 7$ Hz), 2.30 (1H, m), 2.37 (3H, s), 3.71, 3.76 (2H, AB, $J = 11$ Hz), 4.32, 4.48 (2H, AB, $J = 11$ Hz), 4.35 (1H, d, $J = 6$ Hz), 4.63, 4.90 (2H, AB, $J = 12$ Hz), 4.96 (1H, t, $J = 6$ Hz), 5.67 (1H, d, $J = 7$ Hz), 7.17 - 7.71 (20H, m), 8.82 (1H, s), 12.05 (1H, br s). ¹³C-NMR (CDCl₃) δ_c : 18.7, 19.0, 21.6, 26.5, 36.2, 63.5, 69.1, 73.7, 74.3, 78.8, 86.2, 89.5, 127.7, 127.8, 128.0, 128.1, 128.5, 129.7, 130.0, 132.0, 132.6, 132.7, 135.3, 135.4, 137.4, 138.2, 144.8, 146.9, 155.5, 178.5.

(3) 3'-O-ベンジル-5'-O-t-ブチルジフェニルシリル-2'-O, 4'-C-メチレン-N²-イソブチルルグアノシン (46) の合成

窒素気流下、45 (92.1 mg, 0.102 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (3.0 ml) に室温でナトリウムビス (トリメチルシリル) アミド (1.0 M in THF, 0.31 ml, 0.315 mmol) を加えた後、室温で 3 時間撹拌した。反応溶液に飽和重曹水を加えた後、塩化メチレンで 3 回抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムにて乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃-MeOH, 25:1) により精製し、白色粉末 (46) (31.4 mg, 0.160 mmol, 44 %) を得た。

25 mp. 99 - 100 °C. IR ν_{\max} (KBr) : 3162, 3068, 2932, 1683, 1610 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 1.06 (9H, s), 1.25 (3H, d, $J = 7$ Hz), 1.27 (3H, d, $J = 7$ Hz), 2.64 (1H, m), 3.83, 4.01 (2H, AB, $J = 8$ Hz), 3.97 (2H, d, $J = 7$ Hz), 4.18 (1H, s), 4.51 (1H, s), 4.54 (2H, d, $J = 2$ Hz), 5.77 (1H, s), 7.

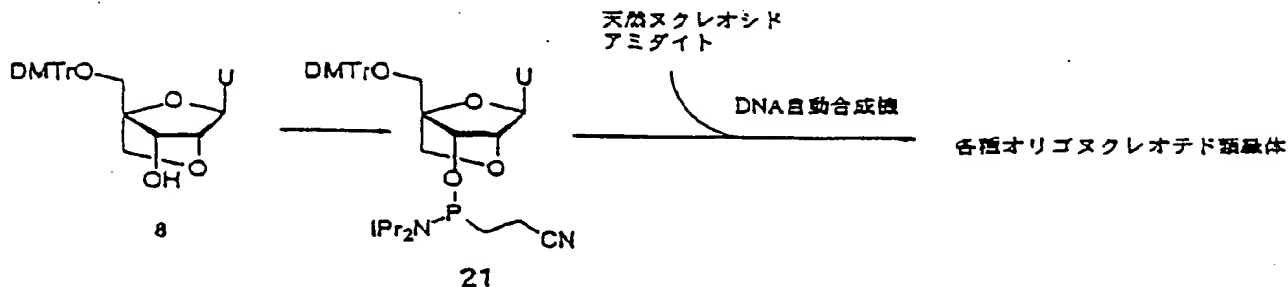
17-7.42 (5H, m), 7.64 - 7.72 (10H, m), 7.84 (1H, s), 9.03 (1H, s), 12.08 (1H, br s). ^{13}C -NMR (CDCl_3) δ c: 18.9, 19.0, 19.1, 26.5, 26.7, 36.4, 59.1, 72.4, 72.5, 76.8, 77.5, 86.3, 88.3, 121.7, 127.6, 127.7, 127.8, 127.9, 128.1, 128.4, 129.6, 130.0, 132.36, 132.42, 134.8, 135.45, 135.54, 135.8, 136.8, 146.8, 147.7, 155.4, 178.6.

(4) 3'-O-ベンジル 1-2'-O, 4'-C-メチレン-N²-イソブチリルグアノシン (47) の合成

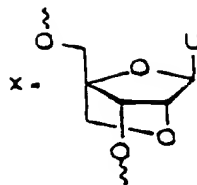
化合物 46 (41.3 mg, 0.060 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (3.0 ml) に室温でテトラブチルアンモニウムフルオリド (1.0 M in THF, 0.90 ml, 0.90 mmol) を加えた後、室温で 1 時間攪拌した。反応溶液を減圧留去して得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (AcOH-EtOH, 20:1) により精製し、白色粉末 (47) (27.1 mg, 0.060 mmol, quant.) を得た。

mp. 228 - 229 °C (Et₂O). $[\alpha]_D^{25} + 32.90^\circ$ (c = 0.875, CHCl_3). IR ν_{max} (KBr): 3162, 2934, 1683, 1608 cm^{-1} . ^1H -NMR (CDCl_3) δ : 1.24 (3H, d, J = 7 Hz), 1.26 (3H, d, J = 7 Hz), 2.76 (1H, m), 3.83, 4.03 (2H, AB, J = 8 Hz), 3.92, 4.02 (2H, AB, J = 13 Hz), 4.33 (1H, s), 4.55 (1H, s), 4.62 (2H, s), 5.80 (1H, s), 7.25 (5H, s), 7.91 (1H, s), 9.85 (1H, s), 12.05 (1H, s). ^{13}C -NMR (CDCl_3) δ c: 19.19, 19.25, 36.4, 57.4, 72.5, 77.0, 77.5, 86.5, 88.8, 121.0, 127.8, 128.1, 128.2, 128.3, 128.4, 128.6, 137.1, 137.5, 147.5, 148.2, 155.7, 179.9.

[実施例 6] オリゴヌクレオチド類縁体の合成



5'-GCGXTTTTGTCT-3' (XT8)
 5'-GCGTTTXXTTGCT-3' (T2XT3)
 5'-GCGTTTXXTTGCT-3' (T3XT2)
 5'-GCGTTTTTXXGCT-3' (T5X)
 5'-GCGXXTTTGTCT-3' (X2T4)
 5'-GCGTTXXTTGCT-3' (T2X2T2)
 5'-GCGTTTTTXXGCT-3' (T4X2)
 5'-GCGXXXXXXGCT-3' (X8)
 5'-GTTTTTTTTTXXC-3' (X2)



(1) 3'-O-[2-シアノエトキシ (ジイソプロピルアミノ) ホスフィノ]-
5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-O, 4'-メタノ

ウリジン (21) の合成

化合物 8 (200 mg, 0.31 mmol)、ジイソプロピルアンモニウム テトラゾリ
ド (39.6 mg, 0.23 mmol) を無水 CH₃CN で 3 回共沸した後、無水 CH₃CN - 無水
THF 溶液 (3:1, 4 ml) とし、窒素気流下 2-シアノエチル N,N,N',N'-テトラ
イソプロピル ホスホロジアミダイト (0.12 ml, 0.37 mmol) を加え、室温で 9 0
分間攪拌した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマ
トグラフィー (AcOEt:ヘキサン:Et₃N = 75:25:1) により精製後、AcOEt-ヘキ
サンにて再沈澱し、アミダイト体 21 (181 mg, 0.25 mmol, 81%) を得た。

mp 71-74 °C (AcOEt-ヘキサン). ³¹P-NMR (CDCl₃): δ 149.6, 149.5, 149.4,
149.3, 149.2.

(2) オリゴヌクレオチド類縁体の一般合成 オリゴマーの合成は Pharmacia 社
製 DNA 合成装置 Gene Assembler Plus により 0.2 μmol スケールで行った。溶
媒、試薬、ホスホロジアミダイトの濃度は天然 DNA 合成の場合と同じである。3'
-水酸基が CPG 支持体に結合した 5'-O-DMTr-チミジン (0.2 μmol) の DMTr
基をトリクロロ酢酸によって脱保護し、その 5'-水酸基に天然 DNA 合成用の 4
種の核酸塩基からなるアミダイトおよび化合物 21 を用いて縮合反応を繰り返し
行い、それぞれの配列のオリゴヌクレオチド類縁体を合成した。合成サイクルは
下記の通りである。

合成サイクル (0.2 μmol scale)

- 1) detritylation 1% CCl₃COOH in CH₂ClCH₂Cl, 6 sec
- 2) coupling 0.1 M phosphoramidite (25 equiv.).

- 0.5 M 1H-tetrazole (500 equiv.) in MeCN, 2 min
- 3) capping 3% 4-(dimethylamino)pyridine, 10% Ac₂O,
 in MeCN, 18 sec
- 4) oxidation 0.01 M I₂ in 2,4,6-collidine/H₂O/MeCN(1:5:11),
 6 sec

合成後は、常法に従って、濃アンモニア水処理によりオリゴマーを支持体から切り出すとともに、リン原子上の保護基シアノエチル基をはずし、さらにはアデニン、グアニン、シトシンの保護基をはずした。

得られた 5' -O-DMTr 化されたオリゴヌクレオチド類縁体は、逆相カラムクロマト (Millipore, Oligo-Pak™ SP) 上でトリフルオロ酢酸 5 ml により DMTr 基をはずし、引き続き精製を行い、目的のオリゴヌクレオチド類縁体を得た。

本一般合成法に従って、以下のオリゴヌクレオチド類縁体を合成した。

(2) 5' -GCGXTTTTGT-3' (XT5)

10 収量 0.06 μmol (30% yield)

(3) 5' -GCGTTXTTTGT-3' (T2XT3)

 収量 0.05 μmol (25% yield)

(4) 5' -GCGTTTXXTTGT-3' (T3XT2)

 収量 0.03 μmol (15% yield)

15 (5) 5' -GCGTTTTTTXGT-3' (T5X)

 収量 0.06 μmol (30% yield)

(6) 5' -GCGXXTTTGT-3' (X2T4)

 収量 0.06 μmol (30% yield)

(7) 5' -GCGTTXXTTGT-3' (T2X2T2)

20 収量 0.05 μmol (25% yield)

(8) 5' -GCGTTTTTXXGT-3' (T4X2)

 収量 0.06 μmol (30% yield)

(9) 5' -GCGXXXXXXGT-3' (X6)

収量 0.06 μ mol (30% yield)

(10) 5' -GTTTTTTTTTXXC-3' (X2)

収量 0.07 μ mol (35% yield)

[実験例1] 融解温度 (T_m) の測定

実施例2で合成した種々のオリゴヌクレオチド類縁体をアンチセンス鎖とし、天然のDNAあるいはRNAからなるセンス鎖とをアニーリング処理したものの融解温度 (T_m 値) を測定することにより、本発明のオリゴヌクレオチド類縁体の相補DNAおよびRNAに対するハイブリッド形成能を調べた。

終濃度をそれぞれ、NaCl 100 mM、リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) 10 mM、アンチセンス鎖 4 μ M、センス鎖 4 μ Mとしたサンプル溶液 (500 μ L) を沸騰水中に浴し、10時間をかけてゆっくり室温まで冷却した。分光光度計 (島津 UV-2100PC) のセル室内に結露防止のために窒素気流を通し、サンプル溶液を5℃まで徐々に冷却し、さらに20分間5℃に保った後、測定を開始した。サンプル温度は90℃まで毎分0.2℃ずつ上昇させ、0.1℃間隔で260 nmにおける紫外線吸収を測定した。なお、温度上昇とともにサンプル濃度

が変化するのを防ぐため、セルは蓋付きのものをを用い、サンプル溶液表面に鉱油を1滴添加して測定した。

結果は、下記の表に示した。

表1. アンチセンスオリゴヌクレオチド類縁体の相補DNA及びRNAに対する融解温度 (T_m 値)

アンチセンス分子	相補 DNA ^{a)} との T_m	相補 RNA ^{b)} との T_m
	(ΔT_m /mod.)	(ΔT_m /mod.)
5'-GCGTTTTTTGCT-3' (天然)	47℃	45℃
5'-GCGXTTTTTGCT-3' (XT5)	50℃ (+3℃)	49℃ (+4℃)
5'-GCGTTXTTTGCT-3' (T2XT3)	49℃ (+2℃)	49℃ (+4℃)
5'-GCGTTTXXTTGCT-3' (T3XT2)	49℃ (+2℃)	50℃ (+5℃)
5'-GCGTTTTTXXGCT-3' (T5X)	52℃ (+4℃)	51℃ (+6℃)
5'-GCGXTTTTTGCT-3' (X2T4)	51℃ (+2℃)	53℃ (+4℃)
5'-GCGTTXXTTGCT-3' (T2X2T2)	49℃ (+1℃)	53℃ (+4℃)

5' -GCGTTTTXXGCT-3' (T4X2)	54°C (+3.5°C)	55°C (+5°C)
5' -GCGXXXXXXGCT-3' (X6)	58°C (+1.8°C)	71°C (+4.3°C)

a): 3' -CGCAAAAAACGA-5'. b): 3' -r(CGCAAAAAACGA).

表から明らかなように、天然DNA鎖中に本発明のヌクレオシド類縁体（一般式（I a））のユニット（X）が1個あるいは2個導入したオリゴマーでは、相補DNAオリゴマーとのハイブリッド形成能が、 T_m 値で評価して天然鎖よりも2-7度（1修飾残基当たり2度程度）上昇し、TをすべてXで置換した（X6）においては11度も上昇した。一方、相補RNAに対するハイブリッド形成能を評価したところ、1個あるいは2個導入したオリゴマーでは天然鎖よりも4-10度（1修飾残基当たり4度から6度）の T_m 値の上昇が認められ、しかも（X6）においては相補RNAに対するハイブリッド形成能が更に強まり、 T_m 値が25度以上（1修飾残基当たり4度）も上昇が認められた。このように、天然鎖よりも T_m 値がかくも上昇する類縁体の例がなく、またDNAよりもRNAに対する親和性が高いことは、本発明のビシクロオリゴヌクレオシド類縁体を構成単位としたオリゴヌクレオチド類縁体がアンチセンス分子として極めて高い性能と医薬品素材としての有用性を有していることを意味していると言える。

[実験例2] ヌクレアーゼ酵素耐性の測定

15 15分間37°Cに保ったオリゴヌクレオチドのバッファー溶液(10 μ M, 400 μ l)に蛇毒ホスホジエステラーゼのバッファー溶液 (0.003U/ml, 400 μ l)を混合した。混合溶液を37°Cに保った石英セル(800 μ l)に入れ、オリゴヌクレオチドの分解による紫外吸収(260nm)の増加をSHIMADZU UV-2100PCを用いて経時的に測定した。用いたバッファーの組成はTris-HCl(pH8.6)0.1M、NaCl 0.1M、MgCl₂14mMであり測定前に十分に脱気した。

半減期($t_{1/2}$)の測定

測定開始時($t=0$)及び紫外吸収が認められなくなった点のUV吸収の平均値を示す時間を半減期 ($t_{1/2}$)とした。

オリゴヌクレオチド配列	$t_{1/2}$ (秒)
-------------	---------------

5'-GTTTTTTTTTTC-3' (天然型) 260

5'-GTTTTTTTTT-XX-C-3' (X 2) 850

また、紫外外部吸収の経時変化を示すチャートを図1 (天然鎖) 及び図2 (X 2) に示した。天然鎖は酸素反応開始後、約30分で紫外外部吸収値が一定となり、X 2では約90分で一定となった。

[産業上の利用可能性]

- 5 この類縁体の使用により、生体内で酵素の加水分解を受けにくく、センス鎖との結合能が高く、しかも合成が容易であるオリゴヌクレオチド類縁体アンチセンス分子が提供される。

〔配列表〕

出願人の氏名：今西武

発明の名称：新規ビスクロヌクレオシド及びオリゴヌクレオチド類縁体

整理番号：

出願番号：

出願日：平成10年3月 日

優先権番号：特願平9-53409号

優先日：平成9年3月7日

配列の数：10

配列番号：1

配列の長さ：12

配列の型：ヌクレオチド

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

5' - GCGTTTTTTTGCT - 3'

配列番号：2

配列の長さ：12

配列の型：ヌクレオチド、ヌクレオチド類縁体

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

5' - GCGXTTTTTTGCT - 3'

配列番号：3

配列の長さ：12

配列の型：ヌクレオチド、ヌクレオチド類縁体

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

5' - GCGTTXTTTGCT - 3'

配列番号：4

配列の長さ：12

配列の型：ヌクレオチド、ヌクレオチド類縁体

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

5' - GCGTTTXXTTTGCT - 3'

配列番号：5

配列の長さ：12

配列の型：ヌクレオチド、ヌクレオチド類縁体

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

5' - GCGTTTTTTXGCT - 3'

配列番号：6

配列の長さ：12

配列の型：ヌクレオチド、ヌクレオチド類縁体

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

5' - GCGXXTTTGTGCT - 3'

配列番号 : 7

配列の長さ : 12

配列の型 : ヌクレオチド、ヌクレオチド類縁体

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列 :

5' - GCGTTXXTTGCT - 3'

配列番号 : 8

配列の長さ : 12

配列の型 : ヌクレオチド、ヌクレオチド類縁体

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列 :

5' - GCGTTTTTXXGCT - 3'

配列番号 : 9

配列の長さ : 12

配列の型 : ヌクレオチド、ヌクレオチド類縁体

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列 :

5' - GCGXXXXXXXXGCT - 3'

配列番号 : 10

配列の長さ : 13

配列の型：ヌクレオチド、ヌクレオチド類縁体

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

5' - G T T T T T T T T T T T T C - 3'

配列番号：11

配列の長さ：13

配列の型：ヌクレオチド、ヌクレオチド類縁体

鎖の数：1本鎖

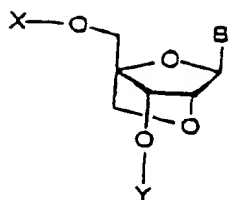
トポロジー：直鎖状

配列：

5' - G T T T T T T T T T X X T C - 3'

請求の範囲

1. 一般式 (I)



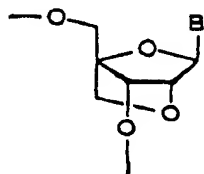
(I)

[式中、Bはピリミジンもしくはプリン核酸塩基又はそれらの類縁体であり、X及びYは同一もしくは異なり、水素、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、アラルキル基、アリール基、アシル基、又はシリル基]で表わされるヌクレオシド類縁体もしくはそのアミダイト誘導体。

2. X、Yがともに水素である請求項1記載のヌクレオシド類縁体。

3. Xが4,4'-ジメトキシトリチル(DMT r)で、Yが2-シアノエトキシ(ジイソプロピルアミノ)ホスフィノ基(アミダイト基)である請求項1記載のモノヌクレオシドアミダイト誘導体。

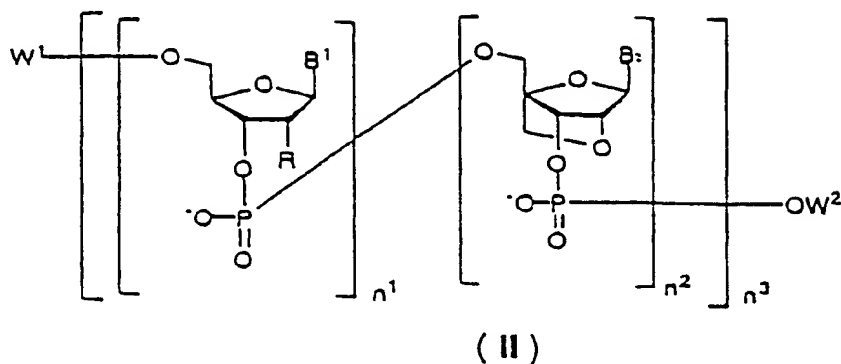
4. 一般式 (I a)



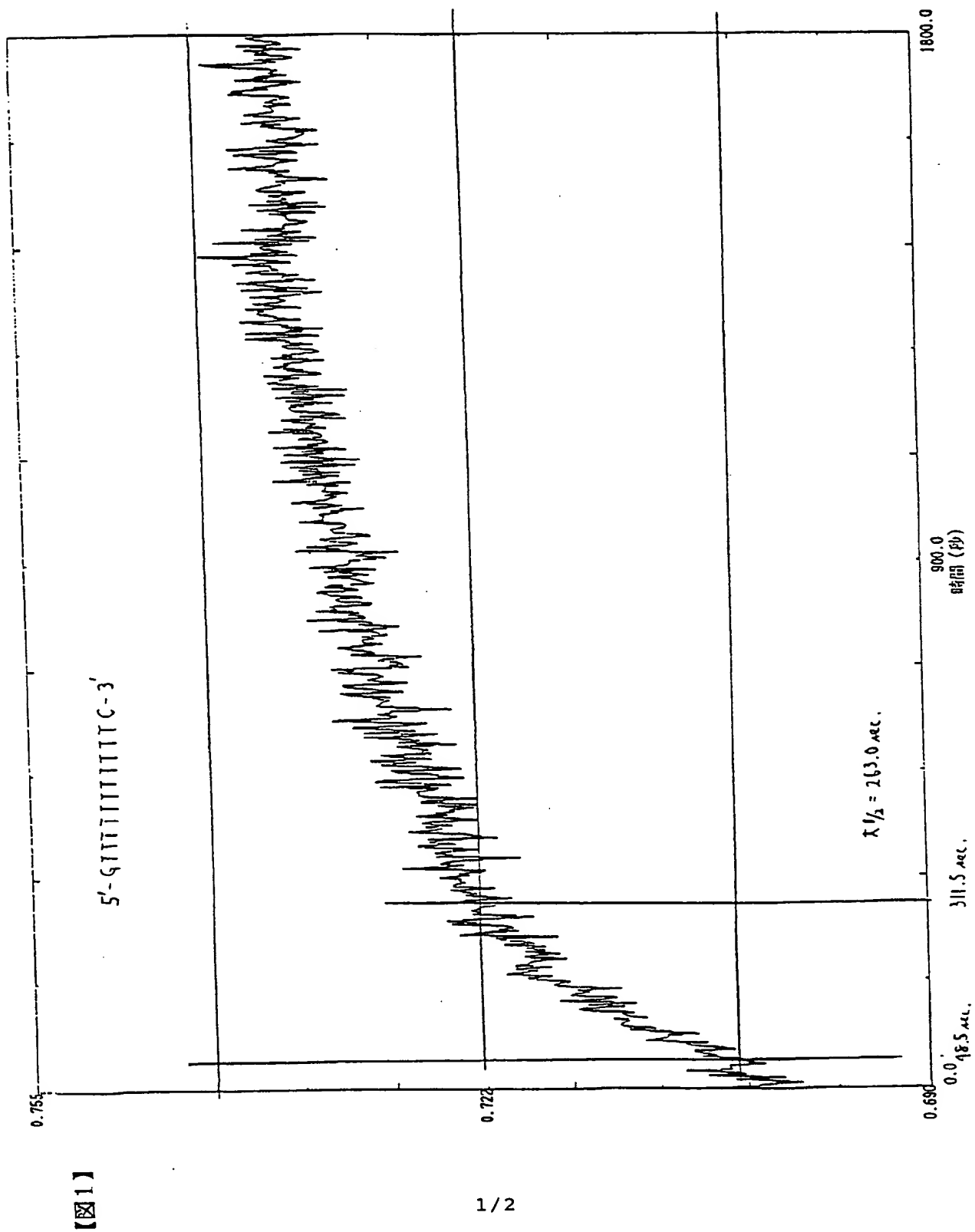
(I a)

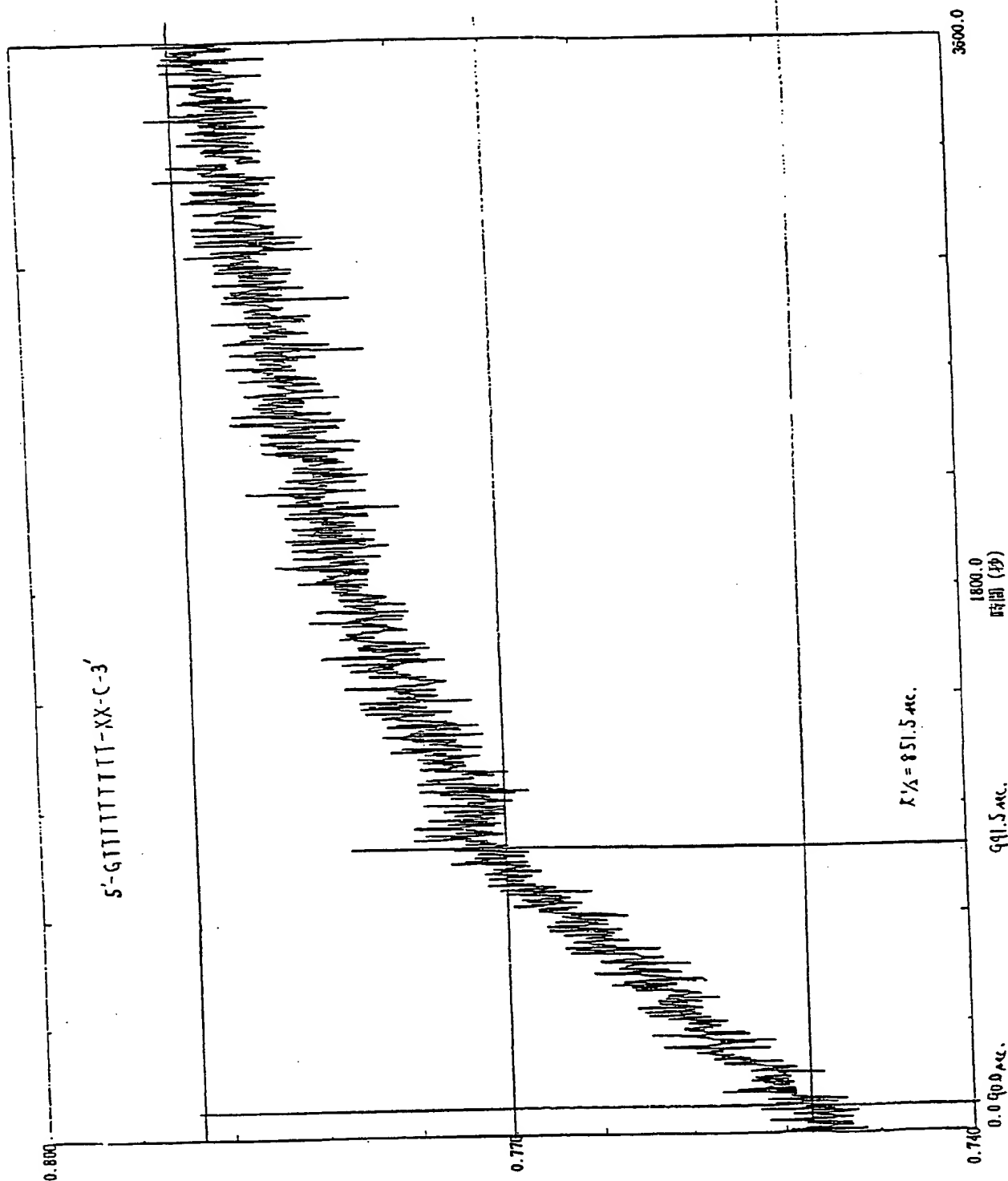
〔式中、Bはピリミジンもしくはプリン核酸塩基又はそれらの類縁体である〕で表される構造を1または2以上有するオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド類縁体。

5. 一般式 (II)



- 5 〔式中、B¹、Bは同一または異なり、ピリミジンもしくはプリン核酸塩基又はそれらの類縁体であり、Rは水素、水酸基、ハロゲン、またはアルコキシ基であり、W¹、W²は同一または異なり、水素、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、アラルキル基、アリール基、アシル基、シリル基またはリン酸残基もしくはリン酸ジエステル結合を介した天然型ヌクレオシド、及び
- 10 その類縁体またはこれらヌクレオシドを含むオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドであり、n¹またはn²は同一または異なり、0から50の整数である（ただし、n¹またはn²が同時にゼロになることはない。またn²のすべてがゼロになることはない。）、n³は1～50の整数である、ただし、n¹および／またはn²が2以上の場合にはB¹とBは同一でなくてもよく、Rも同一でなくても
- 15 よい〕で表されるオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチド類縁体。





【図2】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/00945

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C07H19/06, C07H19/16, C07H21/00 // C12N15/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C07H19/06, C07H19/16, C07H21/00, C12N15/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), CA (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	OBIKA S. et al., "Synthesis of 2'-O,4'-C-Methyleneuridine an d-cytidine. Novel Bicyclic Nucleosides Having a Fixed C ₃ , -en do Sugar Puckering", Tetrahedron Letters, Vol. 38, No. 50 (15 December 1997) p.8735-8738	1-5
A	ALTMANN K. H. et al., "6'-Carbon-Substituted Carbocyclic Analogs of 2'-Deoxyribonucleosides Synthesis and Effect on DNA/RNA Duplex Stability" Tetrahedron, Vol. 52, No. 39 (1996) p.12699-12722	1-5
A	OBIKA S. et al., "Properties of Novel Oligonucleotide Analogues Containing an Acyclic Nucleoside and a Carbamate Linkage" Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Vol. 6, No. 12, (1996) p.1357-1360	1-5

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
 May 25, 1998 (25. 05. 98)

Date of mailing of the international search report
 June 2, 1998 (02. 06. 98)

Name and mailing address of the ISA/
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 98/00945

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ C 07 H 19/06, C 07 H 19/16, C 07 H 21/00// C 12 N 15/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ C 07 H 19/06, C 07 H 19/16, C 07 H 21/00, C 12 N 15/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), CA (STN), REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P、X	OBIKA S. et al., "Synthesis of 2'-O, 4'-C-Methyleneuridine and -cytidine. Novel Bicyclic Nucleosides Having a Fixed C ₃ -endo Sugar Puckering", Tetrahedron Letters, Vol. 38, No. 50 (15 December 1997) p. 8735-8738	1-5
A	ALTMANN K. H. et al., "6'-Carbon-Substituted Carbocyclic Analogs of 2'-Deoxyribonucleosides Synthesis and Effect on DNA/RNA Duplex Stability" Tetrahedron, Vol. 52, No. 39 (1996) p. 12699-12722	1-5
A	OBIKA S. et al., "Properties of Novel Oligonucleotide Analogues Containing an Acyclic Nucleoside and a Carbamate Linkage"	1-5

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 25.05.98

国際調査報告の発送日 02.06.98

国際調査機関の名称及びあて先
 日本国特許庁 (ISA/J P)
 郵便番号 100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
中木 亜希

4C 9282 印

電話番号 03-3581-1101 内線 3454

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Vol. 6, No. 12, (1996) p. 1357-1360	

This Page Blank (uspto)